

## **Zwierzęta w badaniach naukowych – perspektywa z kilku punktów widzenia**

K. TURLEJSKI

*Instytut Biologii Doświadczalnej PAN i Krajowa Komisja Etyczna*

Jeszcze 100 lat temu średnia długość życia wynosiła 35 – 40 lat, a takie choroby jak zapalenie płuc czy cukrzyca były praktycznie wyrokiem śmierci. Wydłużenie średniej długości życia o 20 – 25 lat, a więc o całe pokolenie, zawdzięczamy w przeważającej mierze doświadczeniom na zwierzętach. Pozwoliły też one dokonać przełomowych odkryć pozwalających nam zrozumieć funkcjonowanie naszego ciała, a w szczególności układu nerwowego.

Pomimo tego sukcesu nauki, a częściowo na skutek jej rozwoju, istnieje problem niezrozumienia i negatywnej oceny społecznej badań naukowych na zwierzętach, a także ludzi je prowadzących. Znaczny procent społeczeństwa nie rozumie potrzeby prowadzenia badań na zwierzętach i nie aprobuje tych badań. Częste są opinie, że takie badania są szczególnie okrutne, stale powtarzane, robione dla kariery i nie wnoszą nic do zasobu naszej wiedzy. Przy tym, panuje opinia, że do badań naukowych używa się niezwykle dużej liczby zwierząt, większej niż do jakichkolwiek innych celów. Brak wiedzy o organizacji badań naukowych sprawia, że propaguje się też poglądy o braku regulacji prawnych i kontroli trybu prowadzenia doświadczeń na zwierzętach. Ten zbiór przekonań stanowi wielki problem dla rozwoju nauk biologicznych.

W moim wykładzie będę się starał pokazać rzeczywistą skalę doświadczeń na zwierzętach i udowodnić, że w stosunku do całkowitego zakresu użycia zwierząt przez człowieka, na badania naukowe poświęca się znikomą ich liczbę, zyskując przy tym trwałą wartość, jaką jest wiedza. Przy tym 90% doświadczeń prowadzi się na myszach, szczurach, jednodniowych kurczętach i akwariowej rybce – Danio pręgowanym. Większość procedur doświadczalnych jest też mniej, lub nie bardziej okrutna, niż procedury stosowane przy innych sposobach użycia zwierząt, na przykład w hodowli i przy uśmiercaniu zwierząt na pokarm dla nas i naszych ulubieńców – psów i kotów. Nawet produkcja roślinna pociąga za sobą śmierć zwierząt kręgowych (myszy, szczurów, kretów).

Znaczna część zwierząt, o których mówi się, że zostały użyte do celów naukowych, została użyta do testów toksyczności różnych substancji, które to testy są przepisane prawem. Na ten cel poświęca się 30 – 60% zwierząt doświadczalnych, zależnie od państwa. Badania te nie rozszerzają naszej wiedzy, dają nam jednak pewność, że substancje które będą miały styczność z człowiekiem, są nieszkodliwe. Tu jest jeszcze wielkie pole do zmian, zastąpienia

tych badań równie czułymi testami *in vitro* lub biochemicznymi. Tak stało się z testem na pirogeny. Jednak dopóki takich testów nie ma, musimy używać zwierząt jako najczulszego indykatora potencjalnej szkodliwości różnych substancji.

Obserwuje się też stały spadek użycia w doświadczeniach najbardziej problematycznych gatunków zwierząt – psów, kotów i naczelnych. Jednak niektóre naczelne muszą pozostać obiektem badań, gdyż badania na nich dają najlepsze przybliżenie procesów, zachodzących u człowieka. Rośnie natomiast liczba doświadczeń na myszach transgenicznym, dzięki którym burzliwie rozwija się wiedza o genetycznym podłożu chorób. Jednak hodowla niektórych mutantów stwarza osobniki głęboko upośledzone i cierpiące przez całe życie. W Polsce, z powodu nie dofinansowania nauki, liczba doświadczeń na zwierzętach jest proporcjonalnie dziesięciokrotnie mniejsza, niż w rozwiniętych państwach tej samej wielkości. Obowiązują też prawa dotyczące doświadczeń na zwierzętach nie tylko równie restrykcyjne, co te, które obowiązują w państwach „starej Unii”, ale stawiające więcej warunków.

Wiedza uzyskana w doświadczeniach na zwierzętach całkowicie zmieniła medycynę ludzką i weterynaryjną, badania te rozszerzyły też zakres podstawowej wiedzy biologicznej. Są to wielkie wartości trwałe, które jednak nie zawsze znajdują zrozumienie i uznanie społeczeństwa, nawet gdy korzysta z tych zdobyczy. Musimy być świadomi tego konfliktu nauki z niektórymi wartościami etycznymi oraz odczuciami społecznymi. Nie możemy ignorować tych negatywnych odczuć, musimy w tym zakresie prowadzić dialog ze społeczeństwem, nauczyć się komunikowania społeczeństwu swoich osiągnięć i uzasadniania potrzeby naszej działalności naukowej gdyż bez akceptacji społecznej nie jest możliwe uprawianie nauki. Nie rezygnując z własnych racji, musimy uważnie słuchać, co mówi opinia społeczna i próbować rozumieć dlaczego ma zastrzeżenia. Tak jak wszelka ludzka aktywność, nauka rodzi różne konflikty. Z perspektywy społecznej, nauka popada często w konflikt z etyką, przy czym badania na zwierzętach są jedynie jednym z obszarów konfliktu.

W konkluzji, tak jak nie jest prawdą, że powinno się zaniechać wszelkich badań naukowych, tak też nie jest prawdą, że można prowadzić dowolne badania, bez żadnych ograniczeń i nie oglądając się na aprobatę społeczeństwa. Stosowanie się do zasady „3R” (Reduction, Refinement, Replacement) jest takim wyjściem w stronę społecznych oczekiwań. Podejście takie powinno być zasadą wszelkich badań na zwierzętach, nawet jeśli obiektywnie nie przyczyniają one znaczących cierpień obiektom badań.

## Various aspects of the use of animals in scientific research

K. TURLEJSKI

*Nencki Institute of Experimental Biology and State Committee for the Ethics of Animal Experimentation*

Mere 100 years ago the average length of human life, even in developed countries, was 35 – 40 years. Majority of children died before the age of 5, pneumonia or diabetes was a sentence of quick death and people 50 – 60 years old showed signs of senility. We owe the extension of our productive life for 20 – 25 years, i.e. a whole generation, to achievements of science, in an overwhelming part to experiments on animals. These experiments allowed us to understand the physiology of our body. This refers in the first place to functioning of the nervous system that could not be understood without experimentation on animals.

In spite of this success of science, and partially due to it, there is a problem of lack of understanding of the role science and of the meaning of scientific results by the society. This results in negative evaluation of experiments on animals, as well as of scientists conducting these experiments. A significant fraction of the society does not understand the need of conducting experiments on animals and does not approve them. Many people hold the opinion that these experiments are particularly cruel, that they are repeated many times without any other purpose than personal career of experimenters and that they do not increase our knowledge and do not develop science. Another frequently held opinion claims that scientific research consumes exorbitant numbers of animals, larger than any other form of using animals by humans. Propagation of the distorted picture of scientific research on animals that is presumed to lack legal regulations and control of execution of the experiments on animals is a big problem for development of biological sciences.

In my lecture I will try to show the real scale of using animals in experiments, in relation to other ways of using animals by humans. Such comparison shows that only a tiny fraction of animals (less than 1%) is used for scientific research, while the gain in the form of permanent scientific knowledge, is permanent. More than 90% of experiments are conducted on mice, rats, newly – hatched chicken or small aquarium fish – *Danio rerio*. In over 90% of the scientific procedures animals do not feel pain or severe distress. In most cases they are investigated in terminal narcosis or humanely killed to extract organs or enzymes needed for investigations in vitro. These procedures are not more cruel than those used on a much larger scale in animal breeding and food production, including production of food for our pets. Even production of vegetarian food requires extermination of pests and involves death of vertebrates (mice, rats, moles) on a much larger scale than scientific research.

A significant part of animals used nominally for scientific research is in fact used for tests of toxicity of various substances and products that are required by law. About 30% of experimental animals are used for such tests that do not broaden basic knowledge; however

they assure us that these substances are not harmful for humans or animals. When new, equally sensitive test in vitro are developed, tests on animals are abandoned. This was the case of test for pyrogens. However, we cannot abandon testing on animals before equally sensitive in vitro indicators are developed.

The number of animals from the most problematic species used for scientific research systematically drops. In particular, numbers of primates, dogs and cats are falling. However, some lines of research conducted on primates are so important, that they must be continued because they give the best insight into some processes taking place in humans. In the same time we observe a constant rise of research on transgenic mice. This research gives us a better understanding of the genetic background of some diseases. However, breeding of some genetic mutants produces animals that are deeply disabled and permanently suffering, which is an ethical problem. Poor financing of science in Poland results in comparatively low number of experiments conducted on animals. This number is proportionally ten times lower than in highly developed countries of the same size. In the same time, law concerning animal experimentation is even more restrictive than requirements of the Directive of EU.

Knowledge that we gained from experiments on animals not only broadened our basic knowledge of biology, but also deeply changed human and veterinary medicine. These are permanent gains that however are not fully understood and appreciated by our societies, even if they are constantly using products developed on the basis of this increased understanding. We must be aware of the conflict of scientific values with some ethical social and religious values. Scientists should not ignore negative feelings of the society – just otherwise, they should be in constant dialog with the society. We should learn how to communicate our achievements to the society and how to justify the need of our scientific activity. Without social acceptance conducting of scientific research is not possible. Therefore, we should learn how to listen to the society, understand reasons of reservations of the lay people and in the same time we should defend our views. As every human activity, science brings new developments and new conflicts. From the point of view of the society, science frequently collides with ethics and animal research is only one area of such conflict.

In conclusion, both views that all research on animals must be stopped as soon as possible and that research on animals might be conducted without any regulations and without social approval are equally wrong. One example of such reaching towards a compromise with social expectations is applying the rule of „3R” (Reduction, Refinement, Replacement). This rule should be applied to all research on animals, even if they are harmless and not involving any suffering.

## Modele zwierzęce w badaniach przedklinicznych

A. H. ŚWIERGIEL

*Zakład Zachowania się Zwierząt, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec, 05 – 552 Wolka Kosowska; Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk*

Wykorzystanie modeli zwierzęcych w badaniach przedklinicznych opiera się na założeniu, że podstawowe procesy biologiczne są na tyle podobne u rozmaitych gatunków, że możliwe jest ich porównywanie. Model zwierzęcy jest zwykle rozważany z punktu widzenia jego podobieństwa do modelowanego problemu występującego u człowieka. Niestety, przedkliniczne modele ludzkich schorzeń nie zostały unormowane (zestandardyzowane). Bardzo różnorodne modele zwierzęce są wykorzystywane do badania patogenez, zapobiegania lub leczenia tej samej choroby. Trudno jest zatem interpretować literaturę lub porównywać wyniki badań ponieważ stosowane są bardzo różnorodne i często niewłaściwe modele. Zdarza się, że model jest stosowany ze względu na łatwość jego użycia a nie dlatego, że prawidłowo odzwierciedla proces fizjologiczny. Wykład przedstawia kilka zagadnień związanych z przedklinicznym modelowaniem problemów zdrowia psychicznego, przede wszystkim stanów lękowych oraz depresji.

Pożyteczny model zwierzęcy powinien symulować dokładnie zdefiniowaną chorobę i umożliwić badanie jej etiologii, podstawowych mechanizmów biologicznych oraz leczenia. Co najważniejsze, powinien umożliwiać odkrycie nowych celów terapeutycznych, rozwój nowych terapii oraz wykorzystanie wyników badań podstawowych w klinice. Model zwierzęcy może zostać opisany z punktu widzenia jego:

- a) podobieństwa (*face validity* – podobieństwo czynników wywołujących chorobę oraz symptomów u człowieka)
- b) przewidywalności (*predictive validity* – reakcja oraz podobieństwo odpowiedzi na standardowe kliniczne leczenie),
- c) mechanizmu (*construct validity* – podobieństwo fizjologicznych lub psychologicznych mechanizmów choroby).

Niestety, modele zwierzęce bardzo często ograniczają się do bardzo powierzchownego podobieństwa (*face validity*) odzwierciedlającego procesy różne od występujących w klinicznej sytuacji. Jakkolwiek nowoczesne metody neurobiologiczne są konieczne i pożyteczne, należy zdawać sobie sprawę z tego, że badania *in vitro* nie są w stanie modelować złożonych problemów całego organizmu ani etiologii lub patofizjologii zaburzeń zdrowia psychicznego. Nie są również wystarczające do celów wprowadzenia nowych

terapii. W celu zrozumienia złożoności problematyki przedstawiono kilka przykładów wykorzystania modeli zwierzęcych we własnych badaniach stanów lękowych i depresyjnych.

Jedną z hipotez dotyczących mechanizmów występowania stanów lękowych zakłada, że kortykoliberyna (CRF) i jej receptory stanowią część mechanizmu. Zaproponowano zatem nową klasę anksjolityków bazujących na antagonizmie receptorów CRF. W badaniach myszy bez genu CRF zauważono, że pomimo braku CRF zwierzęta wykazują normalne zachowania lękowe. Zaskakujące wyniki sugerują, że nieznana endogenna substancja, działająca za pośrednictwem receptorów CRF w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) może być odpowiedzialna za zachowania odzwierciedlające lęk.

W innych badaniach obserwowano u myszy i szczurów wpływ chronicznych wstrząsów elektrycznych lub chronicznego unieruchomienia na zachowania depresyjne lub lękowe wywoływane przez ostry wstrząs lub podanie CRF do OUN. W teście wymuszonego pływania, chroniczny wstrząs nie wywoływał wyraźnej “depresji”, jakkolwiek nieco wydłużał okres nieruchomego unoszenia się na wodzie (sugerujący zachowanie depresyjne). Natomiast CRF wydłużał czas nieruchomości. W całkowitym przeciwieństwie do chronicznego wstrząsu, chroniczne unieruchomienie skracało okres nieruchomości. Wynioskowano, że chroniczny stres wpływa na zachowania obronne, natomiast ich charakter zależy od rodzaju stresu a zatem rozmaite czynniki stresujące mogą uaktywniać rozmaite mechanizmy neurofizjologiczne. Fakt, że chroniczny wstrząs skracał okres znieruchomienia (*freezing*) wywołwanego przez ostry wstrząs (odpowiedź behawioralna sugerująca zmniejszony stan lękowy) lub CRF może sugerować, że chroniczny wstrząs zmniejsza wrażliwość OUN na CRF. Z drugiej strony, wydłużenie okresu warunkowego znieruchomienia (*conditioned freezing*) przez chroniczny wstrząs, lub warunkowej ultradźwiękowej wokalizacji (zachowania odzwierciedlające lęk) przez CRF u zwierząt poddanych procedurze chronicznych wstrząsów, sugeruje bardzo skomplikowane mechanizmy zachowań depresyjnych i lękowych.

Jedną z ostatnio proponowanych hipotez zakłada, że cytokiny mogą wywoływać stany depresyjne u ludzi. Hipoteza bazuje, przede wszystkim, na obserwacjach, że a) leczenie przy pomocy cytokin wywołuje symptomy depresji, b) osoby z depresją wykazują podwyższoną aktywność układu odpornościowego, c) depresja występuje częściej w przypadku zaburzeń układu odpornościowego. Pobudzenie układu odpornościowego oraz podanie endotoksyn (np. lipopolisacharydu, LPS) lub interleukiny (IL – 1) wywołuje u zwierząt tzw. “zachowanie chorobowe” (*sickness behavior*) przypominające depresję. Natomiast podawanie antydepresantów zmniejsza objawy zachowania chorobowego wywołane przez LPS lub

IL – 1. Zaproponowano zatem *sickness behavior* jako nowy model zwierzęcy do badania mechanizmów depresji. Okazało się jednak, badając działanie cytokin w “klasycznych” zwierzęcych modelach zachowań depresyjnych, w szczególności zaś u myszy pozbawionych IL – 6, że jakkolwiek powierzchownie *sickness behavior* przypomina depresję, to jednak wykazuje również inne cechy. Tak więc wartość tego modelu w badaniach depresji jest ograniczona i wskazana jest duża ostrożność w interpretacji wyników.

Stopień skomplikowania chorób ludzkich powoduje, że nawet najlepsze modele zwierzęce tylko w ograniczonym stopniu symulują procesy chorobowe występujące u człowieka. Jednakże, dobre zrozumienie braków wybranego modelu zwierzęcego pozwala na prowadzenie skutecznych badań i opracowywania nowych terapii.

## **Animal models for preclinical research**

A. H. ŚWIERGIEL

*Department of Animal Behavior, Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland; Faculty of Biology, Gdansk University, Poland*

In biomedical research, the use of animals to model human diseases relies on the notion that basic biological processes are sufficiently similar across species to allow extrapolation. Animal model validity is usually discussed in terms of the similarity between the model and the human condition it is intended to model. However, preclinical modeling of human disease with animals has not been standardized. Very different animal models are being used to investigate the pathogenesis, prevention, and treatment of the same disease. It is then difficult to interpret available literature data or compare the research results because quite often very diverse and even irrelevant models are used. In fact, some models may be used only for reasons of size or ease rather than the true modeling of a physiological process. The lecture addresses the preclinical animal modeling of some mental health problems, mainly of anxiety and mood disorders.

A useful animal model should simulate a well defined disease and allow studying its etiology, basic biological mechanisms and the treatments. Most importantly, it should allow identification of the new therapeutic targets, development of novel therapies, and the translation of such discoveries to the clinic. A model can be characterized in terms of a) face validity (phenomenological similarity between inducing conditions and specific symptoms of the human phenomenon), b) predictive validity (similarity in response to treatment) and c) construct validity (similarity in underlying physiological or psychological mechanisms). Unfortunately, the validity of animal models is often limited to superficial similarities (face validity) that reflect quite different underlying phenomena and biological processes from the clinical situation. While modern neurobiology methods are necessary, *in vitro* research is not sufficient for multi – level organismic modeling and to elucidate etiology and pathophysiology of mental health disorders and develop new treatments. Examples of research with the use of rodent models with different face – , construct – , and predictive – validity to investigate the nature of anxiety and depression and are presented.

It has been hypothesized that corticotropin – releasing factor (CRF) and its receptors are mediators of anxiety and, therefore, CRF receptor(s) antagonists have been proposed as potential novel therapeutic anxiolytics. We found that mice lacking the CRF gene exhibit normal stress – induced anxiety – like behavior that is specifically blocked by a CRF type 1 receptor antagonist. The unexpected results, among others, suggested that an unidentified



CRF – like molecule other than CRF or urocortin, acting through the CRF receptors in brain regions believed to mediate stress – induced behaviors, may mediate the behavioral response to stress, either alone or in concert with CRF.

In another study the effects of chronic footshock (CF) or chronic restraint (CR) on the behavioral, anxiety – and depression – like responses to acute footshock and corticotropin – releasing factor (CRF) were observed in mice and rats. In the forced swim test, chronic footshock did not induce consistent effects, although there was a trend to increased immobility (depression – like response). However, CRF increased immobility. In striking contrast to chronic footshock, chronic restraint consistently decreased immobility. It is concluded that chronic stress has lasting effects on defensive responses. However, not all chronic stress procedures exert the same effects and thus different forms of stress may activate different neural mechanisms. The fact that CF diminished shock – induced freezing and the effects of CRF on conditioned freezing suggests that CF desensitizes the brain to CRF. On the other hand, the enhancement of conditioned freezing by CF, and of conditioned ultrasonic vocalization (anxiety – like responses) by CRF in CF animals, indicates more complex effects.

It has recently been postulated that cytokines may cause depressive illness in man. This hypothesis rests, mainly, on the observations that a) treatment of patients with cytokines can produce symptoms of depression, b) activation of the immune system is observed in many depressed patients, c) depression occurs more often in those with medical disorders associated with immune dysfunction. Because activation of the immune system, and administration of endotoxin (LPS) or interleukin – 1 (IL – 1) to animals induces sickness behavior, which resembles depression, and chronic treatment with antidepressants has been shown to inhibit sickness behavior responses to LPS, sickness behavior has been proposed as a new animal model of depression. However, while studying the effects of cytokines in classical animal models of depression and, particularly, in interleukin – 6 – deficient mice, it was found that although sickness behaviors resemble the symptoms of depression, each has distinct features. Thus animal models of sickness behavior have limited value for the study of depression, and care should be taken in extrapolating results from such models to the depressive state.

The complexity of the clinical condition inevitably means that even the best animal models are inadequate representations of the condition they seek to mimic. However, a thorough understanding of shortcomings of a chosen animal model still allows studying a disease and developing potentially efficacious new compounds.

## Zwierzęce modele w badaniach skutków niedokrwienia mózgu i próbach terapii ochronnych

B. ZABŁOCKA

*Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, 02 – 06 Warszawa, ul. Pawińskiego 5. [zablocka@cmdik.pan.pl](mailto:zablocka@cmdik.pan.pl)*

Przerwanie dopływu krwi do mózgu powoduje poważne zaburzenia metaboliczne, obserwowane w niedokrwieniu i po przywróceniu krążenia, których pojawianie się badane jest w zwierzęcych modelach *in vivo* i *in vitro* (Adamchik i wsp., 2000; Traystman, 2003). Udar mózgu skutkujący ogniskowym uszkodzeniem wywoływany jest przez zamknięcie przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu szczura lub myszy na okres do kilku godzin (MCAO), w wyniku którego w rejonie niedokrwienia powstaje obszar martwicy otoczony penumbłą. Rozmiar obszaru otaczającego ognisko niedokrwienne zmienia się w czasie po przywróceniu krążenia i prawidłowe funkcje komórek znajdujących się w zewnętrznej części mogą zostać przywrócone, natomiast im bliżej ogniska udaru, tym więcej komórek ulega degeneracji (Zabłocka, 2008).

W badaniach wykorzystuje się kilka modeli krótkotrwałego, całkowitego zatrzymania krążenia mózgowego u zwierząt laboratoryjnych. Wywoływanie u szczura czasowego zatrzymania akcji serca z następującą resuscytacją powoduje całkowity, czasowy brak krążenia mózgowego i odzwierciedla skutki zatrzymania akcji serca w klinice ludzkiej (Pluta i wsp., 1991; Korpachev i wsp., 1982). Dłuższe zatrzymanie krążenia prowadzi do nieodwracalnych zmian i śmierci, natomiast kilkuminutowe niedokrwienie i reanimacja powodują ubytki neuronów w rejonie CA1 hipokampa powstające na skutek wywołanych ekscytotoksycznością glutaminianu zmian obserwowanych w neuronach i komórkach glejowych (Oderfeld – Nowak i wsp., 2003; Sulkowski i wsp., 2006).

W innym modelu przejściowej ischemii przodomózgowia, po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu myszoskoczka (*Meriones unguiculatus*), morfologiczne oznaki ubytku neuronów obserwowane są w sektorze CA1 hipokampów po 2 – 3 dniach reperfuzji (Gadamski i Mossakowski, 1992; Kirino, 1982). Podobny skutek czasowego niedokrwienia mózgu występuje również w modelu ischemii u szczura wywołanej przez zamknięcie obu tętnic kręgowych (stałe) i tętnic szyjnych wspólnych (czasowe) (tzw. 4VO model) (Pulsinelli i Buchan, 1988) czy poprzez czasowe (około 20 min) zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych u szczura z równoczesnym obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi (Eklof i Siesjo, 1972; Friberg i wsp., 2002). We wszystkich modelach ischemii zanik neuronów we wrażliwych rejonach mózgu stanowi kontinuum nekrotyczne – apoptotyczne i ma wiele cech

charakterystycznych zarówno dla procesu nekrozy jak i dla programowanej śmierci komórek – apoptozy. W modelach ischemii uogólnionej u szczura jak i u myszokoczka, po upływie 7 dni od niedokrwienia większość (ponad 80 %) neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa ginie, a złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna poniedokrwienna śmierć neuronów (Domańska – Janik i wsp., 1999; Kirino, 1982).

Szczegółowych informacji o szlakach wewnątrzkomórkowych prowadzących od ischemii do śmierci dostarczają badania prowadzone *in vitro* na hodowlach organotypowych skrawków hipokampa (Rytter i wsp., 2003), hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku czy hodowlach wzbogaconych w neurony kory mózgu uzyskiwanych odpowiednio z 6 – 7 dniowych zwierząt czy z 18 – 19 dniowych płodów szczurów. Skrawki hipokampa stanowią unikalny model do badań *ex vivo*, w którym zachowana jest cytoarchitektura tej struktury, a tym samym oddziaływania między różnymi typami komórek. Jest to doskonały model do przesiewowego badania potencjalnego neuroprotekcynnego działania nowych substancji w celu wytypowania najbardziej skutecznych, które dalej będą testowane w modelach zwierzęcych. W modelach *in vitro* śmierć neuronów wywoływana jest przez czasowe ograniczenie dostępu glukozy i tlenu w pożywce hodowlanej często połączone z obniżeniem pH pożywki do wartości obserwowanych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w modelach *in vivo*, przez pobudzenie komórek glutaminianem, przez stosowanie donorów wolnych rodników czy inhibitorów kinaz białkowych. We wszystkich przypadkach symulowane są warunki występujące w niedokrwionym mózgu, a stosowanie modeli *in vitro* pozwala na śledzenie skutków jednego bodźca, który jest zaledwie elementem złożonego sygnału indukowanego niedokrwieniem.

Badanie szlaków prowadzących do poischemicznej śmierci neuronów, prócz poznania samego zjawiska, ma na celu znalezienie miejsc działania potencjalnych leków hamujących lub ograniczających neurodegenerację. *In vivo* neurony umierające na drodze nekrozy nie są głównym celem protekcji farmakologicznej. Natomiast toczący się godziny i dni proces opóźnionej poniedokrwiennej śmierci neuronów stanowi cel wielu badań neuroprotekcynnych wykorzystujących zarówno hodowle komórkowe jak i modele ischemii *in vivo*. Spośród związków mających za cel proces apoptozy, najbardziej obiecujące efekty ochronne wykazuje cyklosporyna A (CsA), która podana bezpośrednio po epizodzie ischemicznym zapobiega uszkodzeniu neuronów w modelach zwierzęcych (Domańska – Janik i wsp., 2004). Ograniczeniem w stosowaniu CsA jest tzw. wąskie okno terapeutyczne, bowiem podanie tego leku później niż w pierwszych minutach po przywróceniu krążenia nie miało już istotnych

skutków ochronnych w modelach ischemii u szczura i myszokoczka. Jeszcze lepsze skutki ochronne w uszkodzeniu mózgu myszokoczka wykazuje diazepam, który może być podawany z kilkugodzinnym opóźnieniem w stosunku do czasu wywołania niedokrwienia (Sarnowska i wsp. 2009).

Równie istotne są badania skutków czasowego niedokrwienia na komórki względnie odporne na krótkotrwałą ischemię, np. komórki obszarów CA2 – 4 i zakrętu zębatego hipokampa. W modelu niedokrwienia mózgu myszokoczka wykazaliśmy specyficzną ekspresję mRNA i białka dla czynników wiązanych z wewnątrzkomórkowymi mechanizmami ochronnymi. Specyficzna izoforma pro – peptydu insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF – 1) – IGF – 1Ec pojawia się w mózgu dorosłego osobnika po niedokrwieniu tylko w obszarach CA2 – 4 i DG hipokampa, a podanie syntetycznego peptydu opartego na sekwencji C – końcowego odcinka IGF – 1Ec ma działanie neuroprotektyjne na obszarze CA1 (Dłużniewska i wsp. 2005). Podobnie ekspresja genu kodującego białko CHP1, które należy do rodziny białek opiekuńczych pojawia się w komórkach CA2 – 4 i DG po ischemii mózgu myszokoczka, ale nie w obszarze CA1 (Michowski i wsp., 2010). Wydaje się, że wzmocnienie naturalnych procesów indukowanych przez stres i niedokrwienie może stanowić alternatywne podejście do problemu poszukiwania terapii neuroprotektyjnych.

#### BIBLIOGRAFIA

- ADAMCHIK Y., FRANTSEVA M.V., WEISSPAPIR M., 2000. *Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures*. Brain Res Brain Res Protoc. 5(2):153 – 158.
- DŁUŻNIEWSKA J., SARNOWSKA A., BERĘSEWICZ M., JOHNSON I., SRAI S. K. S., RAMESH B., GOLDSPINK G., GÓRECKI D. C., ZABŁOCKA B., 2005; *A strong neuroprotective effect of the autonomous C – terminal peptide of IGF – 1 Ec (MGF) in brain ischaemia*. FASEB J. 19: 1896 – 1898
- DOMAŃSKA – JANIK K., BONG P., BRONISZ – KOWALCZYK A., 1999; *API transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils*. J Neurosci. Res. 57(6):840 – 846.
- DOMAŃSKA – JANIK K., BUŻAŃSKA L., DŁUŻNIEWSKA J, KOZŁOWSKA H, SARNOWSKA A, ZABŁOCKA B, 2004; *Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm*. Brain Res, 121:50 – 59.
- EKLOF B. I SIESJO B.K., 1972; *The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain*. Acta Physiol Scand. 86(2):155 – 165.
- FRIBERG H., WIELOCH T., Castilho R.F., 2002; *Mitochondrial oxidative stress after global brain ischemia in rats*. Neurosci.Lett. 334(2):111 – 114.
- GADAMSKI R. I MOSSAKOWSKI M.J., 1992; *Asymetric damage of the CA1 sector of ammon's horn after short – term forebrain ischemia in Mongolian gerbils*. Neropatologia Polska 30((3/4)):209 – 219.
- KIRINO T., 1982; *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia*. Brain Res. 239(1):57 – 69.

KORPACHEV V.G., LYSENKOV S.P., TEL' L.Z., 1982; [*Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats*]. *Patol.Fiziol.Eksp.Ter.* (3):78 – 80.

MICHOWSKI W., FERRETTI R., WISNIEWSKA M., AMBROZKIEWICZ M., BERĘSEWICZ M., FUSELLA F., SKIBINSKA – KIJEK A., ZABŁOCKA B., BRANCACCIO M., TARONE G., KUZNICKI J., 2010; *Morgana/CHP – 1 is a novel chaperone able to protect cells from stress*. *BBA Mol Cell Res.* 1803 (9):1043 – 1049

ODERFELD – NOWAK B., ORZYŁOWSKA – SLIWINSKA O., SOLTYS Z., 2003; *Concomitant up – regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat*. *Neuroscience* 120(1):31 – 40.

PLUTA R., LOSSINSKY A.S., MOSSAKOWSKI M.J., 1991; *Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology*. *Acta Neuropathol.(Berl)* 83(1):1 – 11.

PULSINELLI W.A. I BUCHAN A.M., 1988; *The four – vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation*. *Stroke* 19(7):913 – 914.

RYTTER A., CRONBERG T., ASZTELY F., 2003; *Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose*. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(1):23 – 33.

SARNOWSKA A., BERĘSEWICZ M., ZABŁOCKA B., DOMAŃSKA – JANIK K., 2009; *Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects*. *Neurochem. Int.* 55 (1 – 3): 164 – 173

SULKOWSKI G., STRUZYŃSKA L., LENKIEWICZ A., 2006; *Changes of cytoskeletal proteins in ischaemic brain under cardiac arrest and reperfusion conditions*. *Folia Neuropathol.* 44(2):133 – 139.

TRAYSTMAN R.J., 2003; *Animal models of focal and global cerebral ischemia*. *ILAR.J* 44(2):85 – 95.

ZABŁOCKA B., 2008; *Apoptoza i nekroza w doświadczalnych procesach niedotlenieniowych i niedokrwienych mózgu* w „Apoptoza w chorobach ośrodkowego układu nerwowego” pod redakcją W. Kozubskiego i J. Dorszewskiej. Wyd Czelej, Lublin pp. 65 – 79.

## **Animal models of brain ischemia: from molecular mechanisms of cell degeneration to neuroprotection**

B. ZABŁOCKA

*Molecular Biology Unit, Mossakowski Medical Research Centre, PAS, 02 – 06 Warsaw, 5 Pawińskiego Str.  
[zablocka@cmdik.pan.pl](mailto:zablocka@cmdik.pan.pl)*

Neuronal injury after transient ischemia is induced by a combination of hypoxia, hypoglycemia and glutamate excitotoxicity. Subsequent complex changes in the activity of signaling pathways and mitochondrial integrity play a role in neurodegeneration as well as in tissue remodeling and repair and all these mechanisms were studied in animal models of brain ischemia and stroke (Adamchik i wsp., 2000; Traystman, 2003).

One of the best studied models of transient forebrain global ischemia is that induced by temporal (5 minutes) common carotid artery occlusion in gerbils (Kirino, 1982). It results in delayed, well – defined lesion in a selected brain area i.e. CA1 sector of hippocampus while the adjacent sectors CA2 – 4 and dentate gyrus (DG) remain intact. The model has been standardized and used with success to study the mechanisms of delayed postischemic neurodegeneration as well as for testing the effect of various neuroprotective treatments in our laboratory (Domanska – Janik et al, 1985; Domanska – Janik and Zablocka, 1993; Sarnowska et al., 2009). The mechanisms of delayed postischemic neurodegeneration include over activation of glutamate receptors, elevation of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration, changes in the activity of kinases, phosphatases, proteolytic enzymes and apoptosom. The involvement of mitochondria in neurodegeneration, but also in the processes evoked by ischemic preconditioning, is crucial for the fate of neurons. The studies in animal models *in vivo* are supplemented by the studies in the *ex vivo* (organotypic hippocampal culture) and primary culture models of neurodegeneration. Mixed primary cultures are prepared from brain cortex of 18 – 19 days old rat embryos while hippocampal slices are prepared from 7 – 10 days old Wistar rats according to the method of Stoppini (Stoppini et al., 1991).

Our *in vitro* study showed that early postischemic treatment of gerbils with cyclosporine A (CsA) injected in a bolus into carotid saved neurons in CA1 hippocampi by inhibition of cytochrome C efflux to cytoplasm. In the primary neuronal culture we showed that CsA inhibits an efflux of cytochrome c from mitochondria and subsequent activation of proteolytic enzyme caspase 3. The other drug, diazepam, administrated in two doses after ischemia (30 min and 1.5 hours) evokes neuroprotection through its central receptors located on the GABAA receptor complex and, possibly, through its peripheral receptor, the translocator protein TSPO (previously called the peripheral benzodiazepine receptor) located in the outer

mitochondrial membrane (Sarnowska et al., 2009). In the organotypic hippocampal culture and in isolated mitochondria we were able to show that diazepam inhibits cytochrome c efflux from mitochondria and that these effects were not blocked by inhibition of GABAA receptor antagonist – bicuculline.

Gerbil model of transient brain ischemia is a perfect model to study the mechanisms of regeneration in CA2 – 4 and dentate gyrus (DG) which remain intact after the insult. We showed that brain ischaemia induces changes in endogenous expression of the specific alternatively spliced IGF – 1 variant (called MGF or IGF – 1Ec in human, IGF – 1Eb in rodents). (Dłużniewska et al., 2005). In the post – ischemic hippocampus the levels of both MGF transcript and the peptide were increased selectively in neurons resistant to the ischemic insult. While MGF is known for its regenerative potential in skeletal muscle, we showed for the first time a role for this IGF – 1 isoform in the brain. Furthermore, we demonstrated that the 24 amino acid C – terminal domain unique to this isoform can function as an autonomous biologically active peptide and is an extremely potent neuroprotective agent *in vivo* and *in vitro*. Such a small and biologically active molecule is a good candidate for development into a therapeutic modality.

We also showed that novel chaperon morgana/Chp – 1 upregulation in response to transient global brain ischemia lasts longer in ischemia – resistant regions of the gerbil hippocampus than in vulnerable ones, suggesting the involvement of morgana/CHP – 1 in natural protective mechanisms *in vivo* (Michowski et al., 2010).

## REFERENCES

- ADAMCHIK Y., FRANTSEVA M.V., WEISSPAPIR M., 2000. *Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures*. Brain Res Brain Res Protoc. 5(2):153 – 158.
- DŁUŻNIEWSKA J., SARNOWSKA A., BERĘSEWICZ M., JOHNSON I., SRAI S. K. S., RAMESH B., GOLDSPINK G., GÓRECKI D. C., ZABŁOCKA B., 2005; *A strong neuroprotective effect of the autonomous C – terminal peptide of IGF – 1 Ec (MGF) in brain ischaemia*. FASEB J. 19: 1896 – 1898
- DOMAŃSKA – JANIK K., BONG P., BRONISZ – KOWALCZYK A., 1999; *API transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils*. J Neurosci.Res. 57(6):840 – 846.
- DOMAŃSKA – JANIK K., BUŻAŃSKA L., DŁUŻNIEWSKA J., KOZŁOWSKA H, SARNOWSKA A, ZABŁOCKA B, 2004; *Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm*. Brain Res, 121:50 – 59.
- EKLOF B. I SIESJO B.K., 1972; *The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain*. Acta Physiol Scand. 86(2):155 – 165.
- FRIBERG H., WIELOCH T., Castilho R.F., 2002; *Mitochondrial oxidative stress after global brain ischemia in rats*. Neurosci.Lett. 334(2):111 – 114.

GADAMSKI R. I MOSSAKOWSKI M.J., 1992; *Asymetric damage of the CA1 sector of ammon's horn after short – term forebrain ischemia in Mongolian gerbils*. *Neropatologia Polska* 30((3/4)):209 – 219.

KIRINO T.,1982; *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia*. *Brain Res.* 239(1):57 – 69.

KORPACHEV V.G., LYSENKOV S.P., TEL' L.Z.,1982; [*Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats*]. *Patol.Fiziol.Eksp.Ter.* (3):78 – 80.

MICHOWSKI W., FERRETTI R., WISNIEWSKA M., AMBROZKIEWICZ M., BERĘSEWICZ M, FUSELLA F., SKIBINSKA – KIJEK A., ZABŁOCKA B., BRANCACCIO M., TARONE G., KUZNICKI J., 2010; *Morgana/CHP – 1 is a novel chaperone able to protect cells from stress*. *BBA Mol Cell Res.* 1803 (9):1043 – 1049

ODERFELD – NOWAK B., ORZYŁOWSKA – SLIWINSKA O., SOLTYS Z., 2003; *Concomitant up – regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat*. *Neuroscience* 120(1):31 – 40.

PLUTA R., LOSSINSKY A.S., MOSSAKOWSKI M.J., 1991; *Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology*. *Acta Neuropathol.(Berl)* 83(1):1 – 11.

PULSINELLI W.A. I BUCHAN A.M., 1988; *The four – vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation*. *Stroke* 19(7):913 – 914.

RYTTER A., CRONBERG T., ASZTELY F., 2003; *Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose*. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(1):23 – 33.

SARNOWSKA A., BERĘSEWICZ M., ZABŁOCKA B., DOMAŃSKA – JANIK K., 2009; *Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects*. *Neurochem. Int.* 55 (1 – 3): 164 – 173

SULKOWSKI G., STRUZYNSKA L., LENKIEWICZ A., 2006; *Changes of cytoskeletal proteins in ischaemic brain under cardiac arrest and reperfusion conditions*. *Folia Neuropathol.* 44(2):133 – 139.

TRAYSTMAN R.J., 2003; *Animal models of focal and global cerebral ischemia*. *ILAR.J* 44(2):85 – 95.



## Wykorzystanie zwierząt w badaniach ischemii mózgu: modele, mechanizmy uszkodzenia i terapia

H. HODGES

*Department of Psychology, Institute of Psychiatry, Kings College, London, UK. (H.Hodges@iop.kcl.ac.uk)*

Wykorzystanie zwierząt w badaniach biomedycznych opiera się na trzech podstawowych założeniach: został wybrany odpowiedni *model* do badania funkcji w warunkach prawidłowego funkcjonowania i danej patologii, co pozwoli na poznanie *mechanizmów* uszkodzenia i może sugerować rozwój metod skutecznej *terapii*. Zwierzęce modele schorzeń występujących u ludzi mogą odzwierciedlać pojedyncze objawy choroby, ale są też takie, które symulują złożone zespoły chorobowe (Willner, 1991). W naszych badaniach wykorzystujemy dwa różne modele ischemii mózgu u szczurów: model ischemii globalnej i ogniskowej, które skutkują różnym obszarem uszkodzenia komórek mózgu i funkcji poznawczych. Globalne, całkowite niedokrwienie mózgu uzyskiwane jest poprzez czasowe (10 – 30 min) zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych przy jednoczesnym zamknięciu tętnic kręgowych (model zamknięcia 4 naczyń, ang. *four vessel occlusion* 4VO) co odpowiada zatrzymaniu akcji serca lub niedrożności tętnicy wieńcowej u ludzi. Ischemia ogniskowa u szczurów, która jest modelem udaru niedokrwienego stanowiącego 60% wszystkich udarów u ludzi, wywoływana jest poprzez czasowe (60 – 90 min) zamknięcie światła tętnicy środkowej mózgu (tzw. model MCAO). Krótkotrwałe niedokrwienie w modelu 4VO skutkuje obustronnym zniszczeniem neuronów w polu CA1 hipokampa, które są wyjątkowo wrażliwe na brak tlenu i glukozy. Dłuższe zaciśnięcie tętnic w modelu 4VO powoduje rozszerzenie uszkodzenia na pozostałe sektory hipokampów oraz inne rejony kory mózgu. Skutki obserwowane w zachowaniu zwierząt obejmują deficyty w uczeniu się i zapamiętywaniu, są szczególnie widoczne w testach wykorzystujących pamięć przestrzenną. Natomiast w modelu MCAO obserwowana jest jednostronna lezja kory mózgu obejmująca do 50% półkuli niedokrwionej oraz prążkowie i wraz z upływem czasu rozprzestrzeniająca się na wzgórze. Uszkodzenie to ma odzwierciedlenie głównie w upośledzeniu koordynacji ruchowej, ale także w uczeniu się i zapamiętywaniu. Niezależnie od różnych efektów morfologicznych oba modele odzwierciedlające różne typy ischemii mózgu mają wiele cech wspólnych. Oba wiernie odzwierciedlają skutki zablokowania przepływu krwi, co skutkuje poischemicznym uszkodzeniem mózgu. Pomimo, że modele te nie oddają przyczyn (ogólny stan organizmu, predyspozycje genetyczne) zablokowania przepływu krwi przez naczynia mózgowie, to odgrywają istotną rolę w badaniach mechanizmów uszkodzenia i śmierci komórek. Dzięki ich wykorzystaniu poznawane są

kaskady reakcji związanych z ekscytotoksycnością i procesami zapalnymi, możliwa jest lokalizacja zmian poniedokrwiennych i czas ich powstawania, jak również skutki behawioralne. Na podstawie wyników tych doświadczeń stawiane są hipotezy o przebiegu procesów ischemicznych, co jest trudne w przypadku prowadzenia badań wyłącznie *in vitro*.

W modelach zwierzęcych istotne jest ustalenie standardów dla poszczególnych modeli, które dotyczą m.in. kontroli temperatury ciała, monitorowania przepływu krwi przez naczynia mózgowe oraz ustalenia protokołów postępowania w czasie reperfuzji mózgu, tak, aby można było porównywać wyniki badań pochodzących z różnych laboratoriów.

Badania wykorzystujące modele całkowitego i ogniskowego niedokrwienia mózgu wskazują potencjalnie neuroprotekcyjne działanie różnych substancji, w tym inhibitorów kanałów wapniowych, antagonistów receptorów NMDA, modulatorów neurotransmisji GABAergicznej i serotonergicznej. Pomimo obiecujących wyników badań w modelach zwierzęcych żaden z typowanych związków nie okazał się skuteczny w klinice ludzkiej. Dotychczas jedynym skutecznym działaniem poprawiającym stan chorych z udarem jest tromboliza, której stosowanie możliwe jest jedynie u części pacjentów. Analiza niepowodzeń w stosowaniu nowych leków u ludzi wskazuje, że przed wprowadzeniem nowej substancji do testów klinicznych, u zwierząt zbyt krótko po epizodzie niedokrwienym prowadzone były obserwacje skutków terapii. Ponadto, oparte były głównie o badania histologiczne, a powinny obejmować też długotrwałe badania funkcjonalne i behawioralne. Ponadto, u ludzi zwykle nie udaje się zastosować leku w wąskim oknie terapeutycznym jak to się dzieje w modelach zwierzęcych. Dodatkowym ograniczeniem jest wykorzystywanie jedynie modeli ischemii mózgu gryzoni, które są względnie odporne na przejściowe niedokrwienie w porównaniu z naczelnymi. Niestety, badania prowadzone do dziś na modelach zwierzęcych nie zostały pozytywnie zweryfikowane w praktyce lekarskiej.

Nasze badania mają na celu znalezienie terapii zapobiegającej śmierci komórek, która oparta byłaby o naturalne procesy rekonstrukcyjne i odpowiedzi troficzne komórek mózgu na uszkodzenie niedokrwienne, a nie zmierzałaby do zahamowania procesów prowadzących do uszkodzenia. Interesującą alternatywą są transplantacje komórek neuralnych, szczególnie komórek macierzystych, które mogą zasiedlać uszkodzone rejony i różnicować się w różne typy komórek mózgu (Gray i wsp., 1999). Transplantacje komórek mogą być testowane w obu opisanych modelach badawczych (4VO i MCAO), w których można badać ich zdolności do naprawy i regeneracji mózgu. Aby zapobiec możliwości przekształcania się komórek macierzystych w komórki nowotworowe, w naszych badaniach wykorzystywano dwie linie komórek warunkowo unieśmiertelnionych, które dzielą się *in vitro*, natomiast

przestają się mnożyć po przeszczepieniu do mózgu. Pierwsza pochodzi z mysiej linii MHP36 i jest wrażliwa na temperaturę, a druga, przygotowana przez firmę ReNeuron, wywodzi się z ludzkich komórek, których podziały sterowane są tamoxifenem (Hodges i wsp., 2007, Pollock i wsp., 2006). Wykazaliśmy, że przeszczepienie komórek zarówno linii mysiej jak i ludzkiej, redukuje deficyty funkcjonalne u zwierząt po ischemii. W modelu 4VO zaobserwowano poprawę zachowania w labiryncie wodnym, co związane jest z poprawą pamięci przestrzennej. W modelu MCAO wykazano zmniejszenie rotacji ciała po podaniu amfetaminy, poprawę czucia i sprawności łap (Hodges i wsp., 2000, 2007; Stroemer i Hodges, 2004). Ponadto, przeszczep komórek MHP36 w modelu 4VO u małych szerokonosych (Hodges i wsp., 2000) poprawiał uczenie się oraz rozróżnianie bodźców warunkowych. Wyniki tych badań sugerują, że poprawa funkcjonalna po transplantacji komórek do mózgu obserwowana jest nie tylko u gryzoni, ale też u naczelnych, co zgodne jest z zaleceniami STAIR (ang. *successive stroke roundtable report*) dotyczącymi prawidłowego prowadzenia badań przedklinicznych z wykorzystaniem zwierzęcych modeli patologii człowieka.

Badania histologiczne sugerują, że niedokrwienie mózgu w dwóch opisywanych modelach aktywuje różne mechanizmy regeneracyjne. Przeszczepienie komórek po 15 minutowym niedokrwieniu w modelu 4VO skutkuje ich włączeniem się w uszkodzony rejon CA1 hipokampa, co wykazano elektrofizjologicznie. W bardziej rozległym uszkodzeniu po 30 minutowym 4VO przeszczepione komórki były rozproszone w całej strukturze hipokampa, co sugeruje ich zdolności do naprawy różnych stref hipokampa (Hodges i wsp., 2000). W odróżnieniu, w modelu MCAO nie zaobserwowano regeneracji obszaru martwicy w ognisku niedokrwieniowym, a przeszczepione komórki przybierały fenotyp komórek prążkowania i były rozproszone wokół ogniska niedokrwieniowego, oraz lokalizowały się w nienaruszonej półkuli przeciwnej. Wyniki te sugerują, że przeszczepione komórki migrują zarówno do miejsca uszkodzenia jak i do obszarów mózgu, które podlegają reorganizacji po zniszczeniu struktur, z których dotychczas dostawały sygnały (Stroemer i wsp., 2005). Zatem przeszczepione komórki mogą wspomagać procesy naprawcze i wzmacniać plastyczność mózgu po niedokrwieniu. Obecnie komórki Ren01 firmy ReNeuron przechodzą testy bezpiecznego użycia w klinice (PISCES – ang. *primary indication of stem cells in stroke*), jednak jest jeszcze zbyt wcześnie aby sugerować, że będą skuteczne w terapii poischemicznej. Wydaje się, że dalsze badania mechanizmów plastyczności mózgu, adaptacji do sytuacji stresowych i mechanizmów regeneracyjnych mogą doprowadzić do znalezienia potencjalnych działań terapeutycznych, a badania te są możliwe jedynie w modelach zwierzęcych.

## BIBLIOGRAFIA

GRAY J.A., HODGES H., SINDEN J.D.,1999; *Prospects for the clinical application of neural transplantation with the use of conditionally immortalized neuroepithelial stem cells.* Phil Trans R.Soc. Lond. B 354, 1407 – 1421.

HODGES H., POLLOCK K., STROEMER P., PATEL S., STEVANATO L., REUTER I., SINDEN J.,2007; *Making stem cell lines suitable for transplantation.* Cell Transplantation 16 (2) 101 – 115.

HODGES H., SOWINSKI P., VIRLEY D., NELSON A., KERSHAW T.R., WATSON W.P., VEIZOVIC T., PATEL S., RASHID T., FRENCH S.J., CHADWICK A., GRAY J.A., SINDEN J.D., 2000; *Functional reconstruction of the hippocampus.* In Neural Transplantation in Neurodegenerative Disease Novartis Foundation Symposium 231, John Wiley, Chichester pp 53 – 65.

POLLOCK K., STROEMER R., PATEL S., STEVANATO L., HOPE A., MILJAN E., HODGES H., PRICE J., SINDEN J.D., 2006; *A conditionally immortal Clonal Stem Cell Line from Human Cortical Neuroepithelium for the treatment of Ischemic Stroke.* Exp. Neurol. 199, 143 – 155

STROEMER R.P., HODGES H., 2005; *Stem cell transplantation following Middle Cerebral Artery Occlusion.* In Read S.J. and Virley D. Stroke Genomics: Methods and Protocols. Humana Press. Totowa, NJ, USA.

WILLNER P.,1991; *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical perspectives.* Cambridge University Press.

## **Animals in brain ischaemia research: models, mechanisms and methods for treatment**

H. HODGES

*Department of Psychology, Institute of Psychiatry, Kings College, London, UK. (H.Hodges@iop.kcl.ac.uk)*

Use of animals in biomedical research is based on the ‘3 Ms’: choice of appropriate *models* to study normal and abnormal function, which give us understanding of the *mechanisms* involved, and in turn lead to the development of *methods* for effective clinical treatments. Animal models range from simple screening systems to expression of symptoms, and even simulations of complex syndromes (Willner, 1991). They also differ in reliability, in terms of face, predictive or construct validity. We have focused on two different models of brain ischaemia in the rat, global and focal, which result in very different patterns of brain damage and functional impairments. Global ischaemia, a model for cardiac arrest or coronary artery occlusion, involves transient (10 – 30 min) interruption of blood flow to the brain by bilateral occlusion of vertebral and carotid arteries (four vessel occlusion: 4VO). Focal ischaemia, a model for embolic stroke, is induced by blockage of a major artery for 60 – 90 min, chiefly occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), because this is implicated in 60% of human strokes. Short durations of 4VO result in selective bilateral damage to the CA1 hippocampal, field, which is vulnerable to lack of oxygen. At longer durations, cell loss extends to other hippocampal regions and to cortex. Behavioural effects are confined to impairments in learning and memory, particularly in spatial tasks. In contrast, MCAO results in massive unilateral lesions with up to 50% loss of tissue on the affected side, including most of the striatum, extending to cortex, and reaching the thalamus over time. Behavioural deficits include both motor and sensorimotor impairments, as well as deficits in learning and memory.

Despite their different effects, 4VO and MCAO, as symptomatic models of types of ischaemia, share important similarities. Both have strong face validity in that they mimic the effects of vascular blockage leading to ischaemic brain damage, and its motor and cognitive symptoms. Although they do not simulate the environmental and genetic causal factors that contribute to ischaemic incidents in man, they have provided a wealth of information about the mechanisms of cell death – the cascade of cellular reactions to excitotoxic and inflammatory processes, the location and time course of cell death, and the resulting functional impairments – hence they contribute to construct validity of hypotheses for ischaemic processes far more effectively than studying the behaviour of oxygen – deprived cells in a dish. Moreover, laboratories strive to standardize methodologies (controlling body temperature, monitoring blood flow, implementing post – operative care protocols), so that

surgical effects are consistent within and between research centres, increasing the predictive validity of the models.

Global and focal ischaemic models have generated many ‘cerebroprotective’ approaches to halt progress to cell death, including calcium channel blockers, NMDA receptor antagonists, and modulators of GABA or 5 – HT transmission. Despite improving cell survival in animal models, most compounds have failed in clinical trials. To date, the only effective treatments for stroke are thrombolytics. Successive stroke roundtable (STAIR) reports have tried to pinpoint reasons for clinical failures including short – term histological rather than long – term functional endpoints, failure to hit the narrow therapeutic window, and preclinical use of rodents which are resistant to stroke, rather than more susceptible nonhuman (nh) primates. However, improved models have not improved clinical success rates. The apparent strength and validity of ischaemic models have simply not yet translated into clinical efficacy.

Our approach has been to look for treatments which are effective after cell death, and which harness the reconstructive and trophic responses of the brain to ischaemic insults, rather trying to interrupt the excitotoxic cascade. Neural transplantation, particularly grafting of stem cells, which integrate into regions of brain damage and differentiate into appropriate cell types, provide a promising alternative (Gray et al., 1999). Selective loss of hippocampal CA1 cells following 4VO and indiscriminate unilateral striatal damage after MCAO offer a stringent test of the flexibility of stem cell repair. To reduce the chance of tumour formation we used conditionally immortal stem cell lines which divide in vitro but switch off division after grafting into brain; initially the murine MHP36 line which uses a temperature sensitive switch and subsequently human cell lines developed by ReNeuron Ltd. with a tamoxifen dependent switch (Hodges et al 2007; Pollock et al 2006). We found that grafting of stem cell lines, both murine and human, reduced functional deficits in ischaemic animals. 4VO rats showed improved spatial learning and memory in the water maze; MCAO rats showed reduced rotational bias in response to amphetamine, improved paw reaching skills and reduced sensory neglect (Hodges et al., 2000, 2007; Stroemer and Hodges 2004). MHP36 cells even improved conditional discrimination learning in marmosets with selective hippocampal lesions (a model for 4VO; see Hodges et al 2000) suggesting that functional efficacy extends to primate species, as advocated by STAIR guidelines.

Histological findings strongly suggested that the two ischaemic models engage different repair mechanisms. The tight alignment of grafted cells within the area of CA1 cell loss after 15 min of 4VO, together with their electrophysiological response to stimulation of

the host perforant pathway, suggested functional repair of a specific break in the hippocampal circuit. With more extensive cell loss following 30 min of 4VO, grafted cells were more widely distributed throughout the hippocampus, suggesting cell replacement occurred over several subfields (Hodges et al 2000). In contrast, there was no evidence for repair to the large fluid filled hole (infarct) in the striatum created by MCAO. Rather, grafted cells, which differentiated into appropriate striatal phenotypes, were widely scattered both around the infarct and within the intact contralateral hemisphere, suggesting that they were attracted both to regions of direct damage, and to areas undergoing reorganization in response to loss of input (Stroemer et al., 2005). Hence, grafted cells may have assisted processes of remodeling and plasticity in stroke brain and recruited previously silent pathways to assist functional recovery. It is too early to say whether ReNeuron's Ren01 cells, now undergoing the PISCES (primary indication of stem cells in stroke) clinical safety trials, will fare any better than previous cerebroprotective approaches. However, focus on neural plasticity, the brain's adaptive responses, and processes of functional recovery, rather than interventions to prevent cell death, provide a new range of potential therapeutic targets, which cannot be investigated without the use of animal models.

#### REFERENCES

- GRAY J.A., HODGES H., SINDEN J.D., 1999; *Prospects for the clinical application of neural transplantation with the use of conditionally immortalized neuroepithelial stem cells*. Phil Trans R.Soc. Lond. B 354, 1407 – 1421.
- HODGES H., POLLOCK K., STROEMER P., PATEL S., STEVANATO L., REUTER I., SINDEN J., 2007; *Making stem cell lines suitable for transplantation*. Cell Transplantation 16 (2) 101 – 115.
- HODGES H., SOWINSKI P., VIRLEY D., NELSON A., KERSHAW T.R., WATSON W.P., VEIZOVIC T., PATEL S., RASHID T., FRENCH S.J., CHADWICK A., GRAY J.A., SINDEN J.D., 2000; *Functional reconstruction of the hippocampus*. In Neural Transplantation in Neurodegenerative Disease Novartis Foundation Symposium 231, John Wiley, Chichester pp 53 – 65.
- POLLOCK K., STROEMER R., PATEL S., STEVANATO L., HOPE A., MILJAN E., HODGES H., PRICE J., SINDEN J.D., 2006; *A conditionally immortal Clonal Stem Cell Line from Human Cortical Neuroepithelium for the treatment of Ischemic Stroke*. Exp. Neurol. 199, 143 – 155
- STROEMER R.P., HODGES H., 2005; *Stem cell transplantation following Middle Cerebral Artery Occlusion*. In Read S.J. and Virley D. Stroke Genomics: Methods and Protocols. Humana Press. Totowa, NJ, USA.
- WILLNER P., 1991; *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical perspectives*. Cambridge University Press.

## **Praktyczne aspekty opieki nad zwierzętami na podstawie wybranych modeli neurologicznych**

P. SOWIŃSKI

*Europejskie Stowarzyszenie Lekarzy Weterynarii Zwierząt Laboratoryjnych*

W pracy usługowej zadaniem lekarza weterynarii jest leczenie chorego organizmu, chore zwierzę jest podmiotem naszego działania. W badaniach naukowych sytuacja jest inna. Liczba zwierząt używanych w jednym projekcie jest zwykle duża i stają się one tu bardziej przedmiotem. Podmiotem natomiast jest cel naukowy. Zakres pracy lekarza weterynarii to m.in. zapewnienie badaniom naukowym usług specjalistycznych w zakresie chirurgii, anestezjologii, opieki przed i po operacyjnej, opieki okresu stanu krytycznego, czy wreszcie znajomości zasad humanitarnego zabijania. Lekarz weterynarii to także opiekun dobrostanu zwierzętarni jako całości. Podstawową zasadą badań naukowych prowadzonych na dużej liczbie przypadków jest jedność działań w celu otrzymania wiarygodnych wyników. Gdy zachodzi potrzeba klinicznej interwencji nie można ograniczyć jej do jednego lub dwu zwierząt z grupy nawet, jeśli tylko one tej interwencji wymagają. Nasze działanie musi wtedy obejmować wszystkie osobniki w grupie. Trzeba jednak zawsze pamiętać, że jakakolwiek interwencja farmakologiczna może zmieniać wyniki obserwacji naukowych. Tak dzieje się np. w przypadku modeli neurologicznych, kiedy farmakologia, w ogólnym tego słowa znaczeniu, wpływa ochronnie lub niszcząco na neurony.

Częste, bo codzienne branie do ręki szczura, podczas opieki pooperacyjnej (np. podczas wykonywania zastrzyków) powoduje, że zwierzę zaczyna się przyzwyczajać – „oswajać”, – co w przypadku badań behawiorystycznych jest oczywiście nie do przyjęcia, jeśli reszta zwierząt z grupy nie jest podobnie traktowana.

Zasady obowiązujące przy prowadzeniu badań naukowych narzucają lekarzom weterynarii inne wymagania i zmianę podejścia. Przeanalizujemy to na przykładzie czterech modeli doświadczalnych a obserwacje poczynione będą na podstawie wieloletniej pracy autora z tymi modelami. Pierwsze dwa to modele ostrego zaburzenia krążenia mózgowego – ogniskowe niedokrwienie mózgu i ogólne niedokrwienie mózgu. Dwa kolejne to model obumarcia neuronów w zwojach mózgowych oraz model zaniku neuronów w ciałku prążkowanym. Jakkolwiek modele te można stosować z użyciem różnych zwierząt, to skupimy się tu na szczurach, zwierzętach powszechnie używanych w badaniach behawiorystycznych (Holloway i wsp., 2011, Ramaswamy i wsp. 2007; Meredith i wsp.2008).



*Ogniskowe niedokrwienie mózgu* – udar, technika chirurgiczna zwana MCAo, czyli przemijające zamknięcie światła jednej z tętnic mózgowych i wywołanie miejscowego niedokrwienia tkanki mózgowej (Modo i wsp., 2000 (a); Veizovic i wsp., 2001). Czas zamknięcia jest ustalony protokołem badań i waha się zwykle pomiędzy 60 – 90, a niekiedy 120 minutami.

*Ogólne niedokrwienie mózgu* (stan występujący przy zawałach serca) to technika zwana 4VO – eksperymentalne zablokowanie 4 głównych tętnic w odcinku pozaczaszkowym i wywołanie ogólnego niedokrwienia mózgu (Modo i wsp., 2000 (b)). Na okres ustalony protokołem badań zamyka się tętnice od 15 do 30 minut. W tym okresie czasu dopływu krwi do mózgu jest odcięty w 95% – 98%.

*Uszkodzenie neuronów poprzez domózgowe wstrzyknięcie toksyn* to kolejne dwa modele naśladujące procesy patologiczne w mózgu, toczące się w chorobie zwanej parkinsonizmem, oraz płasawica Huntingtona (Hodges i wsp., 1995).

Te części protokołu badań, które dotyczą tworzenia modelu i opieki nad zwierzętami będą omawiane podczas wystąpienia. Pierwszym warunkiem sukcesu w tworzeniu modelu jest odpowiedni *dobór* zwierzęcia. Do operacji używa się zwierzęta zdrowe i uprzednio behawiorystycznie przetestowane (Modo i wsp. 2002). Szczep zwierzęcia jest czynnikiem istotnym dla powodzenia badań, ze względu na różnice w budowie anatomicznej ukrwienia mózgu u różnych szczurów. Drugim ważnym czynnikiem jest przedoperacyjna masa ciała, gdyż wpływa ona na przetrwanie zwierzęcia w okresie pooperacyjnym. Na podstawie wielu prób i błędów ustaliliśmy w praktyce, że szczury szczepu Sprague Dawley, o wadze 350g +/- 30g, używa się przy tworzeniu modeli Udaru, PD i HD, a szczury szczepu Wistar, o wadze 250 – 280g do modelu globalnego niedokrwienia. W przypadku niedokrwienia mózgu wskazane jest używanie zawsze tego samego modelu zwierząt, będących w tym samym wieku, ze względu na różnice anatomiczne dotyczące koła tętniczego mózgu (Circle of Willis). Koło tętnicze cechuje się dużą zmiennością i u niektórych zwierząt bywa, że nie jest w pełni wykształcone lub zmienia się z wiekiem (Wang – Fischer i wsp. 2008). Przed przystąpieniem do zabiegu chirurgicznego należy dobrać odpowiednią narkozę (uwaga na działanie ochronne), zapewnić podczas operacji monitorowanie temperatury ciała (uwaga na działanie ochronne), liczby oddechów a także wymiany gazowej. Należy się zastanowić nad stosowaniem w okresie pooperacyjnym środków przeciwbólowych o działaniu centralnym, tak istotnych z punktu widzenia dobrostanu zwierzęcia. Trzeba jednocześnie pamiętać o właściwościach ochronnych tych środków na zamierające neurony i biorąc pod uwagę czas tego procesu ustalić plan ich stosowania.

Drugą naturalną częścią opieki jest *terapia płynami* na zakończenie zabiegu. I tu znowu mamy poważne obostrzenia ze względu na wpływ glukozy na zamierające neurony. Podskórny wlew z zastosowaniem tylko 0.9% NaCl jest dopuszczalny w modelu *globalnego niedokrwienia mózgu*. Natomiast w modelach *PD* i *HD* dopuszczalne jest użycie mieszanki glukozy 4% z obojętnym płynem fizjologicznym.

Czas po zabiegu – dzieli się na następujące etapy: dzień “O”, 1 – 7 dni, 8 – 14 dni, 15 – 20 dni oraz 21 (plus) dni. Zachodzą wtedy podstawowe różnice w opiece nad zwierzętami, zarówno od strony weterynaryjnej jak i hodowlanej. Jako przykład posłużyć może model MCAo, w którym czasami po operacji występuje przemijający lekki niedowład języka. Pasza miękka jest wtedy łatwiejsza do jedzenia od twardego granulatu. Należy pamiętać, że objawem prawidłowego uszkodzenia mózgu w modelu HD są często objawy śrubowego kręcenia (toczenia), występujące w 1 – 2 godzin po zabiegu i trzeba to umieć odróżnić od ataków epileptoidalnych, jako objawów powikłania po zabiegu.

Tej i innych patologii musi być świadomy lekarz oraz zespół pracowników na co dzień opiekujący się zwierzętami. Suma ocen zachowania zwierzęcia oraz jego fizjologii daje dopiero pełen obraz przy podejmowaniu kroków eliminacji z doświadczenia. Zachowanie równowagi między ogólnym stanem zwierząt a specyfiką patologii modelu jest istotniejsze niż kurczowe trzymanie się masy ciała, jako czynnika eliminującego z doświadczenia. Wpływ zabiegu chirurgicznego na stan ogólny zwierzęcia może być zmniejszony poprzez stosowanie a) limitów wagowych wspomnianych powyżej b) terapii płynami c) wzbogacania diety oraz stosowanie papek i namoczonego granulatu w początkowym okresie po operacji.

Wiedza chirurgiczna osoby wykonującej zabiegi i jej znajomość aseptyki musi być wysoka, aby gwarantować niewielki stopień powikłań pooperacyjnych. Nie można dopuścić, aby zwierzę nie tylko walczyło z chirurgicznymi konsekwencjami modelu, ale również z powikłaniami spowodowanymi septyczną operacją.

Coraz rzadziej występującym w praktyce błędem jest pozostawienie zwierząt po operacjach w myśl zasady nie interweniowania, aby tylko najsilniejsze przeżyły. Naszą rolą jest właśnie w tym okresie szczególna troska o dobrostan zwierzęcia. Pro – aktywne czytanie karty codziennej opieki, obserwowanie pobierania pokarmu i innych czynności fizjologicznych oraz niesienie pomocy, gdy tylko zauważamy problemy, to codzienne zadania personelu. Do opieki okresu pooperacyjnego dobiera się doświadczonych i przeszkolonych pracowników technicznych a lekarz weterynarii powinien być wtedy częstym gościem w zwierzętarni.

## BIBLIOGRAFIA

- MODO M, STROEMER RP, TANG E, VEIZOVIC T, SOWINSKI P, HODGES H., 2000; *Neurological sequelae and long – term behavioural dysfunction in a rat model of stroke*. J Neurosci Methods.; 194: 99–109.
- MODO M, SOWINSKI P, HODGES H., 2000; *Conditional discrimination learning in rats with global ischaemic brain damage*, Behavioural brain research 111(1 – 2):213 – 21, .
- MODO M., STROEMER R.P., TANG E., VEIZOVIC T., SOWINSKI P., HODGES H., 2002; *Implantation site of stem cell grafts affects behavioural recovery from stroke damage*. Stroke 33, 2270 – 2278.
- HODGES H., SOWINSKI P., SINDEN J.D. NETTO C.A. AND FLETCHER A ., 1995; *The selective 5 – HT<sub>3</sub> antagonist, WAY100289, enhances spatial memory in rats with ibotenate lesions of the forebrain cholinergic projection system*. Psychopharmacol. 117, 318 – 332.
- HOLLOWAY P. M., SMITH H. K., RENSHAW D., FLOWER R. J., GETTING S. J., GAVINS F. N. E., 2011; *Targeting the melanocortin receptor system for anti – stroke therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 32 (2), 90 – 98.
- RAMASWAMY S., MCBRIDE J. L., KORDOWER J. H., 2007; *Animal Models of Huntington's Disease*. ILAR Journal, 48(4), 356 – 373.
- ME. GE, SONSALLA PK, CHESSELET MF., 2008; *Animal models of Parkinson's disease progression*. Acta Neuropathol. 115(4):385 – 9.
- VEIZOVIC T, BEECH JP, STROEMER RP, WATSON WP, HODGES H., 2001; *Resolution of Stroke Deficits Following Contralateral Grafts of Conditionally Immortal Neuroepithelial Stem Cells*, Stroke.;32:1012.
- WANG Y. –. KOETZNER F. L., 2008; *Four – Vessel Occlusion Stroke Model in Rats in Manual Model of Stroke in Rats*. CRC Press, 177 – 182

## **Practical aspects of perioperative care of laboratory animals based on chosen neurological models**

P. SOWINSKI

*ESLAV representative in the UK and Poland*

For veterinarians a different approach needs to be taken when looking after the health of the laboratory animals than looking after the health of companion animals. Although the animals' well – being is of paramount importance for the staff, veterinary services need to take in to account the needs of the research, and whether, any intervention contradicts the applied scientific investigation.

In general effectively managed perioperative care improves the animals' recovery by minimizing their pain and distress thus improving the well – being of the animal and the quality of research data derived from that animal.

The researcher together with the animal care staff and institutional veterinarian are all essential members of the perioperative care team. It is crucial that communication between these team members is well established to create an environment in which a perioperative care program, tailored to the research needs, can be effectively managed.

Personnel who will be involved with perioperative management and care should be selected with particular attention to assure that they are appropriately trained. By law, the researcher is responsible for the care of animals used and the others are only providing him/her with their support. The role of the veterinary services is an advisory one.

Written post – operative records including date, time, person making the observations, condition of animals, and any treatments/procedures performed are considered critical for documenting animal well – being as well as tracking animal care and use at a facility and should be maintained for examination by regulatory inspections. A veterinarian should be involved in establishing, reviewing, and overseeing medical and animal use records.

For the purpose of this presentation, the development of an effective perioperative care program will be broken down into a few overlapping stages; pre surgical planning, intraoperative management and postoperative support. The latter is very often neglected after recovery from anaesthesia and monitoring is often less intense. Our experience shows the first 7 – 14 days post op period as a vital period and it should include attention to basic biologic functions of intake and elimination and to behavioural signs of postoperative pain, monitoring for postsurgical infections, monitoring of the surgical incision site for dehiscence, and timely removal of skin sutures, clips, or staples. In neurological models we “keep an eye” on the

operated animals up to 21 days post surgery. Since the nature of the surgical activity in a particular model will largely determine the type of perioperative program required, evaluation of this activity should be an ongoing part of the overall animal care program.

In this presentation the author will be sharing a long established animal perioperative care program based on neurological models of Global and Focal Brain Ischemia as well as models of Parkinson and Huntington neurodegenerative diseases.

## **Funkcja kalbindyny D – 28k w koordynacji ruchowej**

J. J. BARSKI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach*

<sup>2</sup>*Katedra i Zakład Fizjologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach*

Kalbindyna D – 28k (kalbindyna) jest wewnątrzkomórkowym białkiem cytoplazmatycznym należącym do tzw. rodziny “EF – hand”, posiadającym zdolność wiązania jonów wapniowych. Białko to jest obecne w wielu populacjach neuronalnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, jego lokalizacja nie jest jednak związana z żadną zdefiniowaną morfologicznie czy fizjologicznie subpopulacją komórkową. Kalbindyna i zbliżone do niej białka wiążące wapń mają zdolność modulowania wewnątrzkomórkowej sygnalizacji wapniowej działając jako bufony jonów wapniowych. Fizjologiczna funkcja tych białek jest ciągle mało poznana. Nowe dane na temat ich roli są efektem badań prowadzonych z wykorzystaniem myszy transgenicznym pozbawionych ekspresji tych białek. Zwierzęta o uogólnionej mutacji genu kalbindyny charakteryzują się trwałym i bardzo specyficznym upośledzeniem koordynacji ruchowej, ujawniającym się jednak tylko w sytuacji konieczności dostosowania zachowania do nowego otoczenia. Na możliwe zaangażowanie kalbindyny w proces koordynacji ruchowej wskazuje jej lokalizacja w mózdzku, gdzie obecna jest ona wyłącznie w komórkach Purkiniego. Wyłączenie ekspresji kalbindyny nie powoduje zmniejszenia populacji komórek Purkiniego, a jedynie bardzo subtelne zmiany morfologiczne ich kolców dendrytycznych.

Chcąc potwierdzić przypuszczalną funkcję kalbindyny w komórkach Purkiniego wykorzystaliśmy system tkankowo specyficznej rekombinacji DNA – Cre/loxP i stworzyliśmy linię myszy transgenicznym, u których ekspresja kalbindyny została wyłączona tylko w komórkach Purkiniego kory mózdzku. Otrzymane wyniki wykazały zaangażowanie kalbindyny w regulację wapniozależnych procesów komórkowych oraz zależność prawidłowego przetwarzania informacji sensorycznej od obecności kalbindyny w tych neuronach.

## **Role of calbindin D – 28k in motor coordination**

J. J. BARSKI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Center for Experimental Medicine, Medical University of Silesia, Katowice, Poland*

<sup>2</sup>*Department of Physiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland*

Calbindin D – 28k (calbindin) is a member of the 'EF – hand' family of intracellular calcium – binding proteins. It is expressed in many neurons throughout the central nervous system without general preference for functionally or morphologically defined subpopulations. Calbindin and related calcium – binding proteins can modulate intracellular calcium signaling by acting as calcium buffer. Insight into the physiological roles of these proteins is slowly emerging from studies of nullmutant mice. General calbindin mutants display a distinct and permanent motor discoordination which is revealed only when adaptation of movement to novel environmental conditions is required. In the cerebellum, a brain region regarded a key player in central aspects of motor coordination, calbindin is abundantly expressed exclusively in Purkinje cells and also present in their afferent glutamatergic climbing fibers. Deletion of the calbindin gene is not accompanied by primary or secondary cell loss and very subtle changes of the shape of dendritic spines of Purkinje cells have been reported as the only known morphological consequence of the mutation.

This suggested that nullmutations of the calbindin gene could be used to probe the behavioural roles of Purkinje cells and their intracellular calcium regulation. Using Cre/loxP, technology we have generated Purkinje cell – specific calbindin nullmutant mice and demonstrate that behaviorally relevant processing of a sensory component of cerebellar sensorimotor integration depends on calbindin in Purkinje cells.

## **Okołodobowa neuroplastyczność w mózgu owadów i ssaków**

E. PYZA, J. GÓRSKA – ANDRZEJAK, M. JASIŃSKA

*Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,  
Ingardena 6, 30 – 060 Kraków*

W układzie nerwowym, zarówno w rozwoju jak również w wyniku uszkodzeń, obserwuje się zmiany liczby połączeń pomiędzy neuronami (synaps), a także morfologii neuronów i komórek glejowych, które określa się jako zmiany plastyczne. Ostatnio, podobne zmiany zaobserwowano także w wyniku stymulacji sensorycznej jako neuroplastyczność zależną od aktywności, która zachodzi w mózgu dorosłych zwierząt. Z kolei nasze badania wykazały istnienie jeszcze jednego rodzaju plastyczności – neuroplastyczności okołodobowej. Ten nowy rodzaj plastyczności polega na spontanicznych zmianach liczby synaps oraz morfologii neuronów i komórek glejowych w ciągu doby. Ponieważ te dobowe zmiany utrzymują się także w stałych warunkach środowiska, tzn. w stałej ciemności (constant darkness, DD), przy zachowaniu stałej temperatury i wilgotności otoczenia, są one endogennymi rytmami okołodobowymi, gdyż generuje je wewnętrzny okołodobowy zegar biologiczny. Zegar ten kontroluje rytmikę procesów biochemicznych, fizjologicznych oraz zachowania wszystkich zwierząt, a także człowieka. W stałych warunkach środowiska, np. w stałej ciemności (DD), rytmy te mają okres dłuższy lub krótszy od 24 godz., a synchronizowane są do rytmów dobowych (okres  $\tau=24$  godz.) przez zewnętrzne czynniki środowiskowe, z których najsilniejszym synchronizatorem jest światło.

W układzie wzrokowym muszki owocowej *Drosophila melanogaster* oraz dwóch innych gatunków muchówek stwierdziliśmy, że średnica aksonów neuronów pośredniczących (interneuronów) I – go rzędu, zwanych komórkami jednobiegunowymi L1 i L2, zmienia się w ciągu doby. Ten dobowy rytm zmian przekroju poprzecznego aksonów interneuronów L1 i L2 utrzymuje się też w DD, co świadczy o endogennym generowaniu tego rytmu przez okołodobowy zegar biologiczny. Ponadto rytm zmian wielkości aksonów neuronów L1 i L2 skorelowany jest z rytmiką aktywności lokomotorycznej, więc średnica aksonów L1 i L2 jest największa w okresie wysokiej aktywności lokomotorycznej danego gatunku. U *D. melanogaster* stwierdziliśmy ponadto, że nie tylko aksony wykazują plastyczność okołodobową, ale zmienia się również wielkość jądra komórkowego oraz morfologia dendrytów. Zmiany wielkości interneuronów L1 i L2 nie wywołują jednak dobowych zmian wielkości całej warstwy neuropilu, w której zlokalizowane są te komórki, gdyż zmiany wielkości neuronów kompensowane są przez zmiany wielkości komórek glejowych, występujących w sąsiedztwie tych neuronów. Gdy interneurony L1 i L2 zwiększają średnicę



aksonów i długość dendrytów, komórki glejowe kurczą się. U *D. melanogaster* aksony interneuronów L1 i L2 powiększają się dwa razy w ciągu doby – na początku dnia i na początku nocy. W przypadku dendrytów komórki L2, są one najdłuższe na początku dnia w warunkach LD 12:12 (12 godz. światła i 12 godz. ciemności w ciągu doby).

Interneurony L1 i L2, są komórkami postsynaptycznymi w synapsach tetradycznych, poprzez które z fotoreceptorów oka złożonego owadów przekazywane są informacje świetlne i wzrokowe. Z kolei jedna z tych komórek, interneuron L2 tworzy synapsy zwrotne z fotoreceptorami. Liczba obu typów tych połączeń synaptycznych oscyluje w ciągu doby. U muchy *Musca domestica* liczba synaps tetradycznych zwiększa się w dzień, a synaps zwrotnych w nocy. U *D. melanogaster* liczba synaps tetradycznych rośnie na początku dnia i na początku nocy. W przypadku synaps tetradycznych rytmika zmian ich liczby w ciągu doby utrzymuje się tylko w warunkach LD 12:12, a zanika w DD, natomiast rytm zmian liczby synaps zwrotnych utrzymuje się zarówno w warunkach LD 12:12, jak i DD.

Badania przeprowadzone na mutantach i liniach transgenicznym *D. melanogaster* wykazały, że rytm plastyczności morfologicznej interneuronu L2 oraz plastyczności synaptycznej synaps tetradycznych kontrolowany jest przez główny gen zegara biologicznego *period (per)*. U mutantów null *per*<sup>0</sup> oba rytmy, a także rytm aktywności lokomotorycznej nie występują. Ponadto, kluczowym genem w generowaniu dobowego wzorca zmian morfologii L2 oraz liczby synaps zwrotnych jest gen kryptochromu *cry*. Gen ten pełni funkcję fotoreceptora w neuronach nadrzędnego zegara biologicznego zlokalizowanego w mózgu oraz elementu molekularnego mechanizmu zegara, razem z *per* i innymi genami zegara, w oscylatorach peryferycznych zlokalizowanych w narządach wewnętrznych.

Istotą molekularnego mechanizmu zegara jest cykliczna ekspresja genów zegara i ich białek. Białka te o określonej porze doby przechodzą do jądra komórkowego w komórkach zegara i hamują ekspresję własnych genów (pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego). Zniesienie tego hamowania w wyniku degradacji białek kodowanych przez geny zegara rozpoczyna następny cykl okołodobowego rytmu procesów transkrypcji i translacji w komórkach zegara. Białka genów zegara kontrolują nie tylko ekspresję własnych genów, ale także ekspresję innych genów. Prowadzi to do rytmicznej syntezy wielu białek uczestniczących w procesach komórkowych. W przypadku dobowej rytmiki plastyczności morfologicznej neuronów i komórek glejowych, zegar kontroluje np. rytmiczną ekspresję genów kodujących podjednostki pomp jonowych. Zmiany stężenia jonów oraz dynamiczne zmiany cytoszkieletu odpowiedzialne są prawdopodobnie za obserwowane dobowe zjawiska plastyczności morfologicznej w układzie wzrokowym muchówek. Zegar biologiczny

kontroluje też rytmiczną ekspresję niektórych białek synaptycznych i prawdopodobnie w wyniku tego procesu obserwuje się rytmiczne zmiany liczby niektórych typów połączeń synaptycznych.

Okołodobowe rytmy plastyczności neuronalnej i synaptycznej w układzie wzrokowym owadów generowane są poprzez cykliczną ekspresję genów zegara w fotoreceptorach, komórkach glejowych układu wzrokowego, a także przez sygnał dochodzący do układu wzrokowego z nadrzędnego zegara biologicznego zlokalizowanego w mózgu.

Owady nie są jedyną grupą zwierząt, u których zaobserwowano neuroplastyczność okołodobową. Modelem do tych badań były również myszy szczepu C57BL, a synapsy pobudzające i hamujące, analizowane były w ciągu doby w korze somatosensorycznej mózgu, w tzw. korze baryłkowej. Liczba tych dwóch typów synaps badana była w dzień, w okresie spoczynku oraz na początku nocy w okresie wysokiej aktywności lokomotorycznej tego szczepu myszy. Otrzymane wyniki wykazały, że w nocy wzrasta całkowita liczba synaps zlokalizowanych na dendrytach, a maleje tych zlokalizowanych na kolcach dendrytycznych. Ponadto w nocy, w okresie wysokiej aktywności lokomotorycznej, rośnie liczba synaps hamujących, a nie zmienia się liczba synaps pobudzających.

Wyniki badań przeprowadzonych na dwóch gatunkach zwierząt, z odległych ewolucyjnie grup zwierząt, i w dwóch różnych układach sensorycznych, pozwalają sformułować hipotezę o występowaniu w układzie nerwowym nowego typu plastyczności – spontanicznej neuroplastyczności okołodobowej, generowanej przez okołodobowy zegar biologiczny, która skorelowana jest z okołodobową rytmiką aktywności (czuwania) i spoczynku (snu).

## **Circadian neuroplasticity in the brain of insects and mammals**

E. PYZA, J. GÓRSKA – ANDRZEJAK, M. JASIŃSKA

*Department of Cell Biology and Imaging, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Ingardena 6, 30 – 060 Kraków*

Changes in the number of synaptic contacts, an example of synaptic plasticity, and in morphology of neurons – neuronal plasticity, have been observed during development of the nervous system and in result of brain injury. Recently, both types of plasticity were also observed after sensory stimulation in the brain of adult animals and are called activity – dependent plasticity. We have described a new type of plasticity in the brain – circadian neuroplasticity. This type of plasticity is observed in spontaneous changes of the number of synapses and of morphology of neurons and glial cells during the day. Because these daily changes are also maintained in constant conditions; in constant darkness (DD), and in constant temperature and humidity in the environment, they must be generated endogenously by a circadian clock.

The circadian clock controls endogenous, circadian rhythms in most of biochemical and physiological processes and in behaviour of animals and humans. In constant conditions, for example in constant darkness, a period of circadian rhythms is longer or shorter than 24 h and these rhythms can be entrained to 24 h rhythms ( $\tau=24$  h) by light or by other daily changing external, environmental factors.

In the visual system of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and of two other Diptera species we have detected circadian rhythms in changes of axon diameter of two first order interneurons, so – called L1 and L2 monopolar cells. These rhythms are maintained in DD and it indicates their endogenous, circadian origin. Moreover, these rhythms are correlated with the circadian rhythm of locomotor activity. The locomotor activity of *D. melanogaster* shows two peaks during the day, in the morning and in the evening and both interneurons also swell at the beginning of the day and at the beginning of the night. The daily changes in size of interneurons are offset by changes in morphology of glial cells. They shrink when axons of L1 and L2 monopolar cells are swollen. In addition to changes in the diameter of L1 and L2 axons, also nuclei of L2 cells and their dendritic trees show circadian plasticity.

L1 and L2 interneurons are postsynaptic cells in tetrad synapses that transmit photic and visual signals from the compound eye photoreceptors. In turn L2 cells form feedback synapses back onto the photoreceptors. Both types of synapses oscillate in numbers during the day and night. In the housefly *Musca domestica* the number of tetrad synapses is higher during the day than at night in a day/night regime LD 12:12 (12 h of light and 12 h of darkness). In contrast, the number of feedback synapses is the highest during the night. In *D. melanogaster* the number of tetrad synapses grows twice during the day; in the morning

and in the evening. The rhythms in changes of the number of synapses in both species are maintained in both LD and DD only in the case of feedback synapses. In turn tetrad synapses oscillate in the frequency only in LD.

Using *D. melanogaster* mutants and transgenic lines we have found that circadian plasticity of L2 interneurons and daily plasticity of tetrad synapses is controlled by a clock gene *period* (*per*), a core gene of the molecular mechanism of the circadian clock. In *per*<sup>0</sup> null mutants both rhythms and the circadian rhythm in locomotor activity are abolished. In addition, *cryptochrome* (*cry*) gene, a circadian photoreceptor in the pacemaker neurons and an element of the molecular clock in peripheral oscillators, is involved in regulating circadian plasticity of neurons and synaptic contacts.

The molecular mechanism of the circadian clock is based on cyclical expression of clock genes and their proteins. At particular time of the day these proteins enter the nucleus (negative feedback loop) to block transcription of their own genes. Degradation of those proteins and transcription of the core clock genes begin a new cycle of the molecular clock. Beside own genes, the clock proteins also control expression of clock – controlled genes and in result rhythmic synthesis of many proteins which take part in cellular processes is observed. In the case of circadian plasticity of neurons and glial cells in the visual system of flies, cyclical expression of the subunits of ion pumps may be involved in cyclical swelling and shrinking of those cells. A circadian clock also controls daily expression of some synaptic proteins.

The circadian plasticity of neurons, glial cells and synaptic contacts in the visual system of insects seem to be generated by circadian clocks located in the eye photoreceptors, in glial cells in the visual system and by a circadian input to the visual system from the pacemaker neurons located in the brain.

Insects are not only animals showing circadian neuroplasticity. Using C57BL strain of mice we have found that the number of synapses in the barrel cortex of the brain changes during the day and night. We have observed that during the night, when mice are highly active in locomotor activity, the total number of synapses on dendrites increases but those localized on dendritic spines decreases. In addition during the high locomotor activity the number of inhibitory synapses increases but excitatory ones is not changed.

Our results, obtained using two species from evolutionally distant groups of animals, allow to formulate a hypothesis that in the nervous system, at least in the sensory systems, occurs spontaneous, circadian neuroplasticity. The circadian neuroplasticity is generated by a system of circadian clocks and is correlated with the circadian rhythm of rest (sleep) and activity (wakefulness).

## **Przejawy asymetrii funkcjonalnej półkul mózgowych w badaniach nad zachowaniem zwierząt**

M. TROJAN

*Zakład Psychologii Zwierząt, Wydział Psychologii, Uniwersytet Warszawski*

Przejawy lateralizacji u człowieka, a zwłaszcza stronności kontroli mowy uważano niegdyś za jakościowo jedyną w swoim rodzaju cechę ludzką, która daje podstawę do ogromnej przewagi człowieka nad zwierzętami pod względem zdolności umysłowych. Ponieważ od lat siedemdziesiątych XX w. prowadzono badania nad asymetrią funkcjonalną mózgów zwierzęcych, mimo, że większość badań dotyczyła stronności ruchu kończyn oraz ogonów szczurów lub myszy, to dziś jasne jest że żaden mózg, nawet najmniejszy nie jest strukturalnie prosty (Koch i Laurent, 1999). Obecnie przejawy stronności kończyn, a także lateralizacji mózgowych mechanizmów komunikacji związanych z odbiorem informacji różnych modalności badane są u wielu gatunków zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem naczelnych (Bradshaw, Rogers, 1993; Hauser i Anderson, 1994; Heffner i Heffner, 1984), ptaków śpiewających (Konishi, 1985; McCasland, 1987), a ostatnio także psów (Quaranta, Siniscalchi, Frate i Vallortigara, 2004; Wells, 2003).

Już w 1996 roku Hauser odkrył, że dla ekspresji emocjonalnej u kurcząt, szczurów i małp tak jak u ludzi prawa półkula mózgowa ma większe znaczenie niż lewa. Ponadto rezusy stymulowane przez dźwięki z głośnika ustawionego za małpami odwracały częściej głowę by słyszeć prawym uchem dźwięki wydawane przez inne rezusy (okrzyki wywołane strachem, agresją, lub przyjazne), natomiast lewe ucho nadstawiały częściej, gdy słyszały nawoływania ostrzegawcze wydawane przez gatunek ptaka zamieszkujący te same tereny co małpy (Hauser i Anderson, 1994).

W przypadku psów najwięcej dotychczasowych prac dotyczy badania preferencji przedniej łapy. Lateralizację kończyn sprawdza się najczęściej przez: usuwanie taśmy umieszczonej na nosie bądź kufie psa (Quaranta, Siniscalchi, Frate, Vallortigara, 2004); usuwanie koca z głowy lub wybieranie pożywienia z pojemnika bądź Konga™ (psiej zabawki)(Wells, 2003). Branson i Rogers (2006) wykazali, że stronność łapy ma związek z lękiem przed głośnymi dźwiękami. Psy bez wyraźnie zaznaczonej lateralizacji okazały się reagować silnym lękiem na dźwięk fajerwerków lub burzy, w przeciwieństwie do czworonogów z silnie zaznaczoną stronnością, niezależnie od dominującej strony ciała.

W 2009 roku Guo, Meints, Hall i Mills opisali zjawisko „left gaze bias” polegające na tendencji do patrzenia na prawą połowę twarzy. W eksperymencie wzięło udział 17 psów.

Jako bodźce wyświetlano im zdjęcia z twarzą człowieka, psa, rezusa – zarówno w naturalnej pozycji, jak i odwrócone do góry nogami – oraz fotografia z przedmiotem z codziennego środowiska psa, np. sofy. Okazało się, że tylko w przypadku zdjęć z twarzą ludzką w pozycji naturalnej psy miały tendencję do patrzenia na prawą połowę twarzy. Siniscalchi, Quaranta i Rogers (2008) przeprowadzili na psach badanie podobne do wcześniej wspomnianego eksperymentu Hausera i Andersona, (1994). Ekspozowali bodźce dźwiękowe w postaci odgłosów wydawanych przez psy (lamentacje izolacyjne, grożenie oraz zaproszenie do zabawy) oraz odgłos burzy. Wyniki wskazują na preferencje słuchania prawym uchem (dźwięki odbiera głównie lewa półkula mózgu) odgłosów wydawanych przez psy oraz lewym uchem (dźwięki odbiera głównie prawa półkula mózgu) nasłuchiwanie odgłosów burzy.

W badaniu przeprowadzonym przez nasz zespół zastosowaliśmy nieco odmienne zestawy bodźców. Oprócz bodźców dźwiękowych typu szczekanie psa, lub miauczenie kota, 50 psów usłyszało emitowane słowa wypowiedane przez człowieka. Polecenie „siad” czyli słowo ogólnie znane każdemu psu, oraz „wir” – słowo kontrolne, które nie powinno kojarzyć się z niczym badanym zwierzętom. Mierzono kierunek reakcji orientacyjnej. Otrzymane wyniki są odmienne od uzyskanych przez australijskich badaczy. Zarówno szczekanie psa jak i miauczenie kota były odbierane przez psy częściej lewym uchem, natomiast nie uzyskano zdecydowanej stronności reakcji na ludzkie słowa, bez względu na rodzaj bodźca.

## **Indications of functional asymmetry of the cerebral hemispheres in the studies of animal behaviour**

M. TROJAN

*Department of Animal Behaviour, Faculty of Psychology, University of Warsaw*

Indications of lateralization in human, especially involving speech control was formerly considered only as a human quality, which provides a foundation for enormous predominance of the human over the animals with respect to mental abilities. Because researches about functional asymmetry of the cerebral hemispheres in animals are carried out since the seventies in 20th century – despite that the majority of researches revolved around lateralization of limb and tails movements in rats and mice – today is sure that every brain, even the smallest, is not structurally simple (Koch and Laurent, 1999).

Nowadays researchers are exploring indications of limbs lateralization, and also lateralization of cerebral communication mechanisms connected with reception of information of various modality in many animal species, particularly in primates (Bradshaw, Rogers, 1993; Hauser and Anderson, 1994; Heffner and Heffner, 1984), songbirds (Konishi, 1985; McCasland, 1987), and recently also dogs (Quaranta, Siniscalchi, Frate and Vallortigara, 2004; Wells, 2003).

Hauser discovered in 1996 that the right cerebral hemisphere is more important than the left hemisphere when we consider emotional expression in humans as well as in chickens, rats and monkeys. Furthermore, when he was stimulating rhesus monkeys by sounds from the loudspeaker situated behind them, they turned head more often in order to hear sounds produced by other rhesus monkeys using the right ear (cries caused by fear, aggression, or friendly cheers). They picked up theirs left ear more frequently when they were listening warning call emitted by bird species that inhabit the same territory (Hauser and Anderson, 1994).

In the case of dogs, the vast majority of previous work involved researches of forepaw pREFERENCES. Limbs lateralization is testing most often by: removing a tape situated at a nose or snout (Quaranta, Siniscalchi, Frate, Vallortigara, 2004); removing a blanket from head or getting food from container or Kong (dog toy) (Wells, 2003). Branson and Rogers (2006) proved that paw lateralization is related with a fear of loud noises. Dogs without distinct lateralization reacted to the sound of fireworks or storm with strong anxiety, in contrast to quadrupeds with distinct lateralization (no matter which body side was dominant).

In 2009 Guo, Meints, Hall and Mills described a phenomena called “left gaze bias” – tendency to looking at the right side of the face. In research attended 17 dogs. They had

pictures of human, dog and rhesus faces as stimuli – in natural and inverted position – and also pictures of everyday objects, for instance sofa. It emerged that only in case of pictures of human face in natural position dogs had a tendency to looking at the right side of the face. Siniscalchi, Quaranta and Rogers (2008) conducted a research on dogs which were similar to earlier mentioned experiment of Hauser and Anderson (1994). They exposed sound stimuli like these emitted by dogs (insulation laments, threatening and invitation for play) and sound of storm. The results indicate that dogs prefer to listen sounds emitted by other dogs using the right ear (sounds are received mainly left cerebral hemisphere) and sound of storm through the left ear (these sounds are received mainly right cerebral hemisphere).

In our research we used some different set of stimuli. Except from sound stimuli like dog barking or cat meowing, 50 dogs heard emitted words which were articulated by human. Command “siad” (en. sit), that is a common word for each dog, and “wir” (en. whirl) – a control word, that is not to be associated with anything by tested dogs. The direction of approximate reaction was measured. The results are different from these obtained by Australian researchers. Both dog’s barking and cat’s meowing were received by the left ear, whereas the lateralization of reaction for human words were not obtained, no matter which type of stimulus was used.



## **Badanie mechanizmów zachowania zwierząt – testy behawioralne w naukach biomedycznych**

P. M. BOGUSZEWSKI

*Institut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, p.boguszewski@nencki.gov.pl*

Laboratoryjne testy behawioralne na modelach zwierzęcych są szeroko stosowanym narzędziem badawczym w wielu dziedzinach nauk biomedycznych, zarówno podstawowych jak i aplikacyjnych. Dzięki wykorzystaniu gryzoni laboratoryjnych można m. in. badać anatomiczne, fizjologiczne i molekularne korelaty zachowania się, oddziaływanie znanych środków farmakologicznych oraz testować nowe leki. Istnieje ogromna różnorodność metod badawczych, które określamy wspólnym terminem testów behawioralnych. Zaliczamy do nich zarówno testy, które badają pojedyncze, często wymuszone reakcje, jak i badające złożone zachowanie spontaniczne. W tego rodzaju zastosowaniach celem badań nie jest poznanie zachowania jako takiego. Wykorzystuje się jedynie pewne określone, wybrane wzorce behawioralne traktując je jako narzędzia do obserwacji podstawowych zjawisk i procesów, takich jak uczenie się i pamięć, przetwarzanie informacji emocjonalnej, poziom lęku, agresja międzyosobnicza, i bada ich zmienność pod wpływem różnych czynników.

Takie uproszczone podejście do zachowania się zwierząt ma swoje zalety – testy behawioralne dzięki standaryzacji i automatycznej analizie są doskonałym narzędziem naukowym. Stabilne i powtarzalne warunki eksperymentalne, wykorzystanie szczepów wsobnych lub zwierząt modyfikowanych genetycznie umożliwia w pełni kontrolować warunki doświadczalne. Ponadto badania na zwierzętach pozwalają na dokonywanie różnorodnych manipulacji eksperymentalnych, takich jak wybiórcze uszkodzenia, iniekcje domózgowe, chroniczna implantacja elektrod, których z oczywistych względów nie można stosować u ludzi.

Jednym z ciekawszych podejść eksperymentalnych jest stosowanie testów interakcji społecznej. Z pozoru jest to zjawisko proste, ale jego złożoność i wielowymiarowość powoduje, że często wymyka się ścisłej analizie. Badanie zachowań socjalnych gryzoni w warunkach laboratoryjnych jest doskonałym modelem doświadczalnym do eksperymentalnej analizy zjawisk takich jak emocje, pamięć i uczenie się, agresja, komunikacja i wielu innych. Najważniejszą zaletą tego rodzaju paradygmatów doświadczalnych jest zastosowanie całkowicie naturalnego bodźca - drugiego osobnika - zamiast sztucznych, arbitralnie ustalonych przez eksperymentatora bodźców. Pozwala to na obserwacje naturalnych reakcji behawioralnych przy jednocześnie zachowanej kontroli warunków eksperymentalnych. Ma to ogromne znaczenie, ponieważ poznanie mechanizmów leżących u podłoża interakcji i

umiejętności społecznych jest istotne nie tylko poznawczo, ale także ma zastosowanie w praktyce klinicznej ze względu na zaburzenia zachowania społecznego, takie jak fobia społeczna, autyzm, patologiczna agresja.

Modele zwierzęce w badaniach behawioralnych mają oczywiście wiele ograniczeń i są w różnym stopniu użyteczne do badań naukowych. Szczególnie ważna jest kwestia przenoszenia wyników na zjawiska obserwowane u ludzi. Wyróżnia się trzy podstawowe poziomy modelowania zjawisk i patologii procesów psychicznych: *face validity* (izomorfizm, czyli występowanie podobnych objawów w modelu zwierzęcym i patologii obserwowanej u ludzi), *predictive validity* (wówczas, gdy model zwierzęcy pozwala na przewidywanie działania leków na ludzi - użyteczne przede wszystkim w badaniach farmakologicznych) i *construct validity* (model bazuje na homologicznym podłożu patologii lub reakcji i dzięki temu może rozszerzać naszą wiedzę o mechanizmach badanych zjawisk). Podział ten nie zależy jednak wyłącznie od konkretnego testu, ale również od układu całego eksperymentu i sposobu jego analizy.

Testy behawioralne niewątpliwie są uproszczonym podejściem do zachowania się zwierząt - mogą prowadzić do nadmiernej redukcji informacji i braku kontroli zmiennych, co może przykładowo skutkować odrzuceniem potencjalnie działających środków farmakologicznych na etapie badań nieklinicznych. Jednym z rozwiązań, które może znacząco podnieść czułość i wiarygodność tego typu badań jest stosowanie kilku testów jednocześnie w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną, co pozwala na określenie profilu zachowania poszczególnych osobników i lepszą kontrolę parametrów behawioralnych.

Celem mojego wykładu jest przekazanie słuchaczom najnowszych informacji na temat zastosowania testów behawioralnych na gryzoniach laboratoryjnych, potencjalnej automatyzacji tego rodzaju badań i pokazanie metod analizy materiału doświadczalnego oraz możliwości zastosowania tego typu modeli doświadczalnych zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych.

## **Mechanisms of animal behavior – behavioral tests in biomedical studies**

P. M. BOGUSZEWSKI

*Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, p.boguszewski@nencki.gov.pl*

Behavioral tests on animal models are common tools in biomedical studies. With the use of the laboratory rodents it is possible to investigate anatomical, physiological and molecular correlates of behavior, to test the pharmacological utility of chemical compounds and search for new drugs and therapies. There is a broad variety of experimental methods known as behavioral tests. Some of them are focused on single animal reaction, other are based on wide analysis of spontaneous behavior. The general rule is to observe selected aspects of animal behavior in artificially arranged environment and employ these measurements as variables to explore processes like learning and memory, emotional information processing, anxiety level, aggression etc.

Behavioral test due to reduced approach, between laboratory standardization and automatic analysis became accurate and reliable scientific tools. Stable and replicable experimental condition and use of inbred or genetically modified animals give the researchers full control over experimental conditions. In addition, it is possible to apply additional manipulations, like tissue lesions, intra brain injections, chronic electrode implantation, monitoring of physiological data.

Behavioral tests based on social interaction between two animal are exciting and very useful scientific tools. Social behavior seems to be a quite simple phenomenon, but due to its complexity and multidimensionality is difficult to quantify and analyze. In rodents and other animals social behavior constitute a good model of the human interpersonal functioning. Various paradigms of social interaction in rats have been successfully used to study neuronal mechanisms of anxiety, aggression, domination, social defeat, stress, autism, individual differences in emotional reactivity as well as the effects of anxiogenic and anxiolytic drugs. A key advantage of this approach is a use of natural stimulus i.e. another conspecific animal, instead of artificial objects. In addition, animal reactions that are observed as dependent variables, belong to their natural repertoire.

It should be noted, however, that animal models in behavioral research are also limited in some aspects, mainly due to the problem of between species extrapolation of results. The most important issue is the question to what extent we are able to transfer the knowledge from rodents to human. This issue remains still open and is widely debated. Another problem is that because of reduction of behavioral information and potential improper variability

control, obtained results could lead to rejection of promising chemical compounds. One of potential solution is the usage of multiple tests on one animal (within subject approach) and multidimensional statistical analysis to obtain individual behavioral profile for better parameter's control.

In this talk a contemporary approach to behavioral tests on animal models will be presented along with information about potential experiment's automation and data analysis for both basic and applied scientific research.

## **Jak warunki socjalne przetrzymywania zwierząt wpływają na uczenie się u myszy**

H. J. CASSADAY<sup>1\*</sup>, A. E. FITCHEIT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*School of Psychology, University of Nottingham & <sup>2</sup>Institute of Cellular Medicine, University of Newcastle.*

*\*Correspondence/reprints: [helen.cassaday@nottingham.ac.uk](mailto:helen.cassaday@nottingham.ac.uk)*

Wykorzystanie zwierząt do doświadczeń w Wielkiej Brytanii jest regulowane przez Ustawę o Zwierzętach (Procedury Naukowe) z 1986 r., która wprowadza do prawa etyczne zasady znane jako „3 R” (Replacement, Refinement, Reduction<sup>1</sup>; Russell i Burch, 1959). Lepsze zrozumienie, jak warunki przetrzymywania zwierząt laboratoryjnych wpływają na ich dobrostan przyczyni się nie tylko do udoskonalenia doświadczeń (minimalizacja możliwego bólu, cierpienia, dystresu i długotrwałej szkody), lecz także do ich ograniczenia (gdyż zmniejszona zmienność behawioralna będzie oznaczać potrzebę wykorzystania mniejszej liczby zwierząt).

Myszy domowe na wolności żyją w grupach socjalnych, natomiast laboratoryjne samce myszy mogą być utrzymywane pojedynczo. Twierdzi się, że wzbogacenie środowiska np. przez utrzymanie ich w grupach spowoduje polepszenie zachowań kognitywnych zwierząt laboratoryjnych w testach doświadczalnych. Jednak utrzymanie zwierząt w warunkach socjalnych może być również kosztowne, gdyż ustalenie hierarchii dominacji skutkuje stresem socjalnym. Wykazano, że myszy poddane stresowi socjalnemu wykazują pewne upośledzenia, mają np. wysoki poziom kortykosteronu, względnie niską masę ciała i potencjalnie osłabione odpowiedzi odpornościowe (np. Barnard i in., 1996). Zbadaliśmy, jak agresywne interakcje socjalne wpływają na proces uczenia się u samców myszy CD – 1, wykorzystując uczenie się jako wskaźnik dobrostanu. Chcemy odpowiedzieć na następujące pytania: Czy przetrzymywanie w warunkach socjalnych jest lepsze dla myszy? Jeśli tak, to czy korzystają z tego wszystkie myszy, niezależnie od ich statusu jako osobniki dominujące lub podporządkowane? Czy takie różnice są wrodzone (tym samym niezmiennie), czy warunkowe (czyli mogą ulegać zmianom)? Wpływy warunkowe były na przykład pokazane we wcześniejszych badaniach na naczelnych i myszach. Małpy o niskim statusie „grają rolę głupka”, gdy ich możliwości uczenia się są badane w mieszanych grupach socjalnych, lecz odsłaniają swoje możliwości uczenia się, gdy są badane razem z innymi podporządkowanymi (Drea i Wallen, 1999). Podobnie we wcześniejszych pracach w laboratorium Nottingham,

---

<sup>1</sup> Terminy te są różnie tłumaczone w języku polskim, przyjmując odpowiednio Replacement = zastąpienie, Refinement = udoskonalenie, Reduction = ograniczenie, za polskim tekstem Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Uwaga tłumacza).

uzyskanie statusu dominanta u myszy BKW poprawiało zachowanie w labiryncie promienistym. W tym przypadku zwierzęta były badane w nieobecności jakiegokolwiek, bezpośredniej stymulacji socjalnej (Barnad i Luo, 2002).

W obecnej serii doświadczeń użyliśmy ponownie skali rankingu behawioralnego, by określić utrzymywane w parach samce myszy jako osobniki dominujące i podporządkowane (Mackintosh, 1981). Poziom kortykosteronu był mierzony bezinwazyjnie w moczu (Dahlborn i in. 1996). Dodatkowo, niezależnie od różnic między szczepami (myszy CD – 1 są na ogół mniej agresywne i mają wyższy poziom kortykosteronu niż myszy BKW), stwierdziliśmy u myszy CD – 1 różnice w poziomie kortykosteronu przed połączeniem je w pary. Poziom ten był niższy u myszy, które stały się dominantami. Paradoksalnie jednak, względnie wyższy poziom kortykosteronu obserwowany w okresie przed połączeniem myszy, które stały się podporządkowane, miał tendencję do spadku po połączeniu samców myszy w pary i był porównywalny z poziomem obserwowanym u dominantów (Fitchett i in., 2005a).

Na podstawie tych wyników do dalszych badań behawioralnych wybraliśmy szczep CD – 1. W doświadczeniach z naprzemiennym wyborem w labiryncie T stwierdziliśmy, że myszy podporządkowane, należące do bardziej agresywnych par, wykazywały pogorszenie uczenia się przestrzennego. Co więcej, to pogorszenie było trwałe, gdyż występowało przy powtórzeniu testu, przeprowadzonego tygodnie później, gdy myszy były utrzymywane pojedynczo. Jak wyżej, pomiar kortykosteronu w moczu wskazywał na różnice wrodzone w odpowiedzi na stres, wyższy poziom kortykosteronu w okresie przed połączeniem w pary „wskazywał” na przyszły status myszy podporządkowanej, choć i w tym przypadku nienormalnie wysoki poziom obniżał się, gdy samce były trzymane w parach (Fitchett i in., 2005b). Dalsze doświadczenia z labiryntem T przeprowadzone na mniej agresywnych parach nie wykazały ich wpływu na pozycję w parze, być może dlatego, że w tym doświadczeniu poziom spontanicznego naprzemiennego wyboru był nieoczekiwanie wysoki od pierwszej sesji treningowej. Jednak potwierdziliśmy obserwację, że samce, które przyjmują status podporządkowanych wykazują względnie wysoki poziom kortykosteronu w okresie przed połączeniem ich w pary (po połączeniu, poziom ten spada do poziomu bardziej zbliżonego do obserwowanego u dominantów, choć interakcja między statusem a próbą w tym badaniu nie była istotna statystycznie). Tym niemniej, analiza korelacji pokazała, że im większy spadek poziomu kortykosteronu między próbkami z przed połączeniem pary i po, tym większa dokładność w labiryncie T, natomiast najwyższe poziomy kortykosteronu po połączeniu w pary towarzyszyły zmniejszonej dokładności w labiryncie T (Fitchett i in., 2009).

Z badań wykorzystujących labirynt T wynikają trzy główne wnioski. Po pierwsze, zaburzenia w uczeniu się osobników podporządkowanych były przypisywane uprzednio przy tworzeniu z tych zwierząt grup socjalnych i pozycji, którą w nich zajmowały. W odróżnieniu od tego w parach agresywnych znaleźliśmy dowód na zaburzenia, których nie można było przypisać najnowszym porażkom socjalnym, gdyż trwały przez kolejne tygodnie, gdy zwierzęta były utrzymywane pojedynczo (Fitchett i in., 2005b). Po drugie, wysoki poziom testosteronu mierzony przed połączeniem w pary stanowi dowód na wrodzoną podatność na socjalne porażki (Fitchett i in., 2005b, 2009). Po trzecie, utrzymanie w warunkach socjalnych wydaje się jednak zmniejszać stres, niezależnie od statusu osobnika w grupie (Fitchett i in., 2005b, 2009).

Na podstawie ostatnich wyników zbadaliśmy, czy zapach klatki hodowlanej może być użyty jako wzmocnienie w procedurze warunkowanej preferencji miejsca. Stwierdziliśmy, że zapach klatki stanowi wzmocnienie dla warunkowanej preferencji miejsca u zdominowanych myszy CD – 1, gdyż spędzały one znacząco więcej czasu w poprzednio najmniej preferowanej klatce, gdy dodano do niej wyściółkę z klatki, w której wcześniej przebywały (umieszczoną w tacy pod klatką do warunkowania). Co więcej, podczas warunkowania stwierdziliśmy, że myszy zdominowane defekowały mniej w klatce z wyściółką z klatki hodowlanej, co jest zgodne ze zmniejszoną emocjonalnością. Jednak warunkowa preferencja miejsca (dla uprzednio najmniej preferowanej klatki, po połączeniu jej z zapachem klatki hodowlanej) wyraźnie pokazuje coś więcej niż bezwarunkową preferencję zapachu „domu”. To odkrycie raczej odzwierciedla warunkowanie wyższego stopnia; zapach domu był dostatecznie silnym wzmocnieniem dla myszy zdominowanych, by wytworzyć warunkowanie kontekstowe na bodźce z otoczenia (Fitchett i in., 2006).

Dlatego proponujemy następujące ogólne wnioski dotyczące szczepów myszy: Osobniki podporządkowane są w sposób wrodzony różne i w pewnych warunkach zachowują się względnie gorzej w testach kognitywnych. To sugeruje, że przetrzymywanie w warunkach socjalnych może zwiększać zmienność behawioralną (i w ten sposób działa przeciwko *Ograniczeniu*). Jednak są dowody, że obserwowana zmienność w procesie uczenia się zależy bardziej od różnic wrodzonych niż od czynników socjalnych, a z punktu widzenia *Udoskonalenia* przetrzymywanie zwierząt w warunkach socjalnych sprzyja dobrostanowi. Sygnały wiążące się z klatką hodowlaną są bodźcami wzmacniającymi dla podporządkowanych myszy, wystarczającymi do tego, by mogły one zmodyfikować swoje preferencje w odniesieniu do środowiska. Pomiar kortykosteronu w moczu sugerują, że utrzymywanie myszy w warunkach socjalnych zmniejsza stres. Tak więc, zgodnie

z wcześniejszą pracą (Dahlborn i in., 1996), stwierdziliśmy, że pomiar kortykosteronu pozwala prognozować upośledzenia w uczeniu się. Podsumowując, choć poziom kortykosteronu po połączeniu samców w pary może być użyty do prognozowania, nasze wyniki świadczą o tym, że pomiar przed połączeniem w pary jest prawdopodobnie najbardziej informatywny, gdyż przetrzymywanie w warunkach socjalnych wykazuje tendencję do wyrównania poziomu.

#### BIBLIOGRAFIA

- BARNARD, C.J. & LUO, N., 2002;. *Behav Processes*, **60**, 53 – 59.
- BARNARD, C.J., BEHNKE, J.M., SEWELL, J., 1996;. *Ethology*, **102**, 63 – 84.
- DAHLBORN, K., VAN GILS, B.A.A., VAN DE WEERD, H.A., VAN DIJK, J.E. & BAUMANS, V., 1996;. *Scand J Lab Anim Sci*, **23**, 97 – 106.
- DREA, C.M. & WALLEN K., 1999;. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12965 – 12969.
- FITCHETT, A.E., COLLINS, S.A., MASON, H., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2005a;. *Behav Processes*, **70**, 168 – 176.
- FITCHETT, A.E., COLLINS, S.A., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2005b;. *Neurobiol Learn Mem*, **84**, 247 – 251.
- FITCHETT, A.E., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2006;. *Physiol Behav*, **87**, 955 – 962.
- FITCHETT, A.E., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2009;. *Anim Welfare*, **18**, 21 – 31.
- Mackintosh, J.H., 1981;. *Symp Zool Soc Lond*, **47**, 337 – 365.
- RUSSELL W.M.S. & BURCH R.L., 1959;. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London. (Reprinted 1992, UFAW, Herts, England).



## How social housing affects learning in mice

H. J. CASSADAY<sup>1\*</sup>, A. E. FITCHEIT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*School of Psychology, University of Nottingham &* <sup>2</sup>*Institute of Cellular Medicine, University of Newcastle.*  
*\*Correspondence/reprints: [helen.cassaday@nottingham.ac.uk](mailto:helen.cassaday@nottingham.ac.uk)*

Animal usage in the UK is regulated by the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 which enforces the ethical principles embodied in ‘The 3Rs’ (Replacement, Refinement, Reduction; Russell & Burch, 1959). A better understanding of how laboratory housing conditions affect animal welfare will contribute not only to Refinement (the minimisation of potential pain, suffering, distress or lasting harm) but also Reduction (as reduced behavioural variability will mean that fewer animals need to be used).

In the wild, house mice live in social groups, whereas in the laboratory male mice may be singly housed. Environmental enrichment such as that provided by social housing has been argued to improve the cognitive performance of laboratory animals in experimental tests. However, social housing can also be costly in so far as the establishment of dominance hierarchies results in social stress. Socially stressed mice have been found to show a variety of impairments including high corticosterone, relatively low body weight and potentially depressed immune responses (e.g., Barnard et al., 1996). We tested the cost of aggressive social interactions on learning in male CD – 1 mice, using learning as a welfare indicator, to examine the following research questions: Is social housing better for mice? If so, does this advantage apply irrespective of dominant versus subordinate status? Are any such differences intrinsic (and therefore fixed) or conditional (and therefore subject to change)? Conditional effects have, for example, been identified in previous studies of both primates and mice. Low status monkeys ‘play dumb’ when their learning is tested in mixed social groups but reveal their learning abilities when tested with other subordinates (Drea & Wallen, 1999). Similarly, in an earlier study from the Nottingham laboratory, the acquisition of dominant status in BKW mice was found to improve performance in the radial maze, and in this case the animals were tested alone in the absence of any direct social stimulation (Barnard & Luo, 2002).

In the present series of experiments, we again used objective behavioural ratings to categorise pair – housed male mice as dominant versus subordinate (Mackintosh, 1981). Corticosterone levels were measured non – invasively in urine (Dahlborn et al. 1996). In addition to strain differences (CD – 1 having generally lower aggression and higher corticosterone levels than BKW mice), in CD – 1 mice we identified pre – existing differences in corticosterone levels in that pre – pairing corticosterone levels were lower in mice which would become dominant. Paradoxically, however, the relatively higher

corticosterone levels seen pre – pairing in the mice which would become subordinate, tended to drop post – pairing and to levels comparable to those seen in dominants (Fitchett et al., 2005a).

Based on these findings the CD – 1 strain was selected for further behavioural work. In a study of spatial alternation on a T – maze, we found that subordinate mice from more aggressive dyads showed spatial learning impairment. Moreover, this impairment was persistent in that it was seen in a second replication of the behavioural testing, conducted weeks later, and when the mice were housed alone. As above, the urinary corticosterone measures pointed to intrinsic differences in the stress response in that higher levels of corticosterone pre – pairing ‘predicted’ later subordinate status though again these abnormally high levels were reduced by pair housing (Fitchett et al., 2005b). A follow – up study on the T – maze conducted with less aggressive pairings found no categorical effects of rank, perhaps because, in this experiment, levels of spontaneous alternation on the T – maze were unexpectedly high from the very first training session. However, we did further replicate the finding that mice which would adopt subordinate social status show relatively higher levels of corticosterone pre – pairing (which drop post – pairing to levels more similar to those seen in dominants (though statistically the interaction between rank and sample did not achieve significance in this study). Nonetheless, correlational analyses showed that the bigger the drop in corticosterone, from the pre – to the post – pairing sample, the higher the T – maze accuracy, and that higher post – pairing corticosterone levels were associated with reduced T – maze accuracy (Fitchett et al., 2009).

Thus there are three main conclusions from the T – maze studies. First, learning impairments in subordinates have previously been presumed attributable to the animals’ exposure to, and relative standing within, the social group. By contrast, in aggressive pairings, we found evidence of impairment which could not have been the result of recent social defeat because it persisted weeks later when the mice were housed alone (Fitchett et al., 2005b). Second, high corticosterone levels measured prior to social pairing provide evidence of intrinsic susceptibility to social defeat (Fitchett et al., 2005b, 2009). Third, social housing nonetheless seems to reduce stress, irrespective of social status (Fitchett et al., 2005b, 2009).

Following on from the latter finding we tested the reinforcing capacity of home cage odours using conditioned place preference procedures. We found that cage odours supported conditioned place preference in subordinate CD – 1 mice in that they spent significantly more time in the previously least preferred chamber after it had been paired with exposure to sawdust bedding from the home cage (placed in the tray beneath the conditioning chamber).

Moreover, during conditioning, we observed that subordinate mice defecated less in the chamber with the home cage bedding, consistent with reduced emotionality. However the conditioned place preference (for the previously least preferred chamber after it had been paired with home cage odours) clearly reflects more than an unconditioned preference for the smells of home. This finding rather reflects higher order conditioning: the smell of home was a sufficiently powerful reinforcer for subordinate mice that it produced contextual conditioning to environmental cues (Fitchett et al., 2006).

We therefore suggest the following overall conclusions apply to outbred stains of mice: Subordinates are intrinsically different and, under some circumstances, perform relatively worse on cognitive tests. This suggests that social housing may increase behavioural variability (and in this way work against Reduction). However, there is evidence that the observed variation in learning performance relates to intrinsic differences rather than social factors, and from the Refinement perspective social housing promotes welfare. Home cage cues are reinforcing to subordinate mice, sufficiently so that they can modify preference for environmental context. Urinary corticosterone measures suggest that social housing reduces stress. Thus, in agreement with earlier work (Dahlborn et al. 1996), we find that urinary corticosterone measures provide a non – invasive and objective welfare predictor. In addition, relatively high corticosterone can predict impairment in (the expression of) learning. Finally, although post – pairing corticosterone can be predictive, our findings suggest that pre – pairing measures are likely to be most informative since social housing tends to normalise the levels.

#### REFERENCES

- BARNARD, C.J. & LUO, N., 2002;. *Behav Processes*, **60**, 53 – 59.
- BARNARD, C.J., BEHNKE, J.M., SEWELL, J., 1996;. *Ethology*, **102**, 63 – 84.
- DAHLBORN, K., VAN GILS, B.A.A., VAN DE WEERD, H.A., VAN DIJK, J.E. & BAUMANS, V., 1996;. *Scand J Lab Anim Sci*, **23**, 97 – 106.
- DREA, C.M. & WALLEN K., 1999;. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12965 – 12969.
- FITCHETT, A.E., COLLINS, S.A., MASON, H., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2005a;. *Behav Processes*, **70**, 168 – 176.
- FITCHETT, A.E., COLLINS, S.A., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2005b;. *Neurobiol Learn Mem*, **84**, 247 – 251.
- FITCHETT, A.E., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2006;. *Physiol Behav*, **87**, 955 – 962.
- FITCHETT, A.E., BARNARD, C.J. & CASSADAY, H.J., 2009;. *Anim Welfare*, **18**, 21 – 31.
- Mackintosh, J.H., 1981;. *Symp Zool Soc Lond*, **47**, 337 – 365.
- RUSSELL W.M.S. & BURCH R.L., 1959;. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London. (Reprinted 1992, UFAW, Herts, England).

## **Badanie procesów poznawczych na modelu szczurzym**

M. WĘSIERSKA

*Institut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego PAN Warszawa, Polska*

Zdolność organizmu do odbioru, gromadzenia i wykorzystania informacji, których źródłem są różnorodne bodźce, umożliwia właściwe funkcjonowanie ludzi i zwierząt. Zdolność tę określa się mianem pamięci. Dzięki funkcjonowaniu pamięci i towarzyszących jej procesów poznawczych możliwa jest realizacja bieżących i planowanie nowych zadań. Miejscem zachodzenia tych procesów są wyspecjalizowane struktury układu nerwowego, gdzie informacje pochodzące od bodźców są przekształcane w ślady pamięciowe i przechowywane w takiej formie, która umożliwia ich wykorzystanie kiedy brak jest pierwotnego źródła bodźców. Pamięć klasyfikuje się uwzględniając modalność bodźców (pamięć wzrokowa, słuchowa, smaku czy dotyku), trwałość śladów pamięciowych (pamięć krótko – i długotrwała) lub pełnione przez nią funkcje (pamięć deklaratywna, inaczej uświadomiona lub nieuświadomiona). Pamięć deklaratywna obejmuje kilka rodzajów pamięci, z których pamięć przestrzenna jest wspólna ludziom i zwierzętom. Wiedza na temat funkcjonowania różnych rodzajów pamięci jest niezbędna w walce z deficytami pamięci, które towarzyszą chorobom centralnego układu nerwowego, np. w chorobie Alzheimera, oraz w usprawnianiu procesów uczenia.

W celu poznania mechanizmów odpowiedzialnych za funkcjonowanie pamięci i procesów poznawczych stosowane są modele bazujące na zachowaniu zwierząt, które obejmują testy behawioralne. Zwierzęciem najczęściej badanym w tych testach jest szczur laboratoryjny. W testach zachowanie się szczura jest reakcją zwierzęcia na określoną przez bodźce sytuację doświadczalną. W związku z tym zmieniając parametry doświadczalne: siłę, dostępność lub znaczenie informacyjne bodźców, czy stosując ingerencję farmakologiczną, można oczekiwać zmian zachowania przejawiających się np. zmianą liczby reakcji i długością trwania reakcji czy strategii reagowania. Zmiany takie są miarą funkcjonowania pamięci.

W badaniach pamięci deklaratywnej i procesów poznawczych stosuje się instrumentalne testy na pamięć przestrzenną. Należą do nich testy labiryntowe, takie jak: labirynt ośmioramienny Oltona, labirynt o kształcie Y lub T, test „areny z dołkami” oraz labirynt wodny Morrisa. Warunkiem ich poprawnego wykonania jest odnalezienie miejsca z pokarmem lub ukrytej pod wodą platformy. W fazie wstępnej zwierzęta uczą się zasad testu, czyli właściwego zachowania w celu odnalezienia nagrody: miejsca z pokarmem lub

platformy. Wyuczenie zasad testu w sytuacji, gdy pożądana reakcja jest wzmacniana pokarmem, wymaga wielokrotnych powtórzeń. Miarą pamięci i procesów poznawczych w testach przestrzennych jest trafność i szybkość wizytowania ramion, z których zwierzę nie zjadło jeszcze pokarmu czy dopływanie do platformy. Lokalizacja ramion z pokarmem czy miejsca z platformą nie opiera się na percepcji określonych, pojedynczych bodźców lecz wymaga uformowania reprezentacji przestrzeni na podstawie informacji o relacjach przestrzennych, w jakich pozostają względem siebie odległe i/lub bliskie bodźce różnych modalności, np. bodźce wzrokowe, węchowe, dotykowe.

Niedawno wprowadzonym testem do badania pamięci przestrzennej jest Test Unikania Miejsca. W teście tym szczur ma zapamiętać lokalizację, a następnie unikać niczym nieoznaczonego obszaru (miejsca) areny, przebywanie na którym jest karane słabym bodźcem bólowym (bardzo słaby szok elektryczny podawany na łapy szczura). Do określenia lokalizacji tak wyróżnionego miejsca względem przestrzeni mogą posłużyć odległe i/lub bliskie bodźce różnych modalności oraz informacje powstające w organizmie zwierzęcia podczas poruszania się. Na stacjonarnej arenie w oświetlonym pokoju wszystkie dostępne bodźce będą źródłem użytecznych informacji do zapamiętania położenia wyróżnionego miejsca. Natomiast w sytuacji, w której arena obraca się w oświetlonym pokoju, a wyróżnione miejsce pozostaje w stałym położeniu jedynie względem odległych bodźców z pokoju, informacje pochodzące od bodźców z areny i z poruszania się będą mylące. W ciemności, kiedy wyróżnione miejsce porusza się wraz z areną, wszystkie dostępne bodźce, czyli z poruszania się i z areny, będą źródłem użytecznych informacji. Dzięki tym różnym aranżacjom bodźców Test Unikania Miejsca pozwala na badanie obu rodzajów pamięci przestrzennej: pamięci allotetycznej, bazującej głównie na informacjach pochodzących od odległych bodźców wzrokowych oraz pamięci idiotetycznej, bazującej na informacjach z poruszania się i bodźcach bliskich. Zmiany warunków doświadczenia, czyli jednoczesnej lub niejednoczesnej prezentacji bodźców użytecznych i/lub nieużytecznych dla zlokalizowania wyróżnionego miejsca, umożliwiają badanie nie tylko różnych rodzajów pamięci przestrzennej i relacji między nimi, ale również pamięci deklaratywnej i towarzyszących jej procesów poznawczych, takich jak, plastyczność i koordynacja poznawcza. Koordynacja poznawcza bazuje na procesach odpowiedzialnych za segregację informacji pochodzących od bodźców użytecznych i mylących. Dzięki tym procesom możliwe jest unikanie wyróżnionego miejsca na obracającej się arenie, kiedy pozostaje ono w stałych przestrzennych relacjach względem odległych bodźców z pokoju. Natomiast konieczność wykorzystania poprzednio mylących bodźców (bodźce z areny

i z poruszania się), jako bodźców dostarczających użytecznych informacji, wymaga plastyczności poznawczej. Taka sytuacja wydarza się, kiedy unikanie wyróżnionego miejsca wymaga najpierw uformowania reprezentacji miejsca na bazie pamięci allotetycznej (wyróżnione miejsce w stałym położeniu względem użytecznych, odległych, bodźców z pokoju), a następnie na bazie pamięci idiotetycznej (wyróżnione miejsce w stałym położeniu względem użytecznych bodźców z areny). Test Unikania Miejsca służy również do badania pamięci operacyjnej i funkcji wykonawczych. W tym celu, w każdej kolejnej sesji wyróżnione miejsce prezentowane jest w innym położeniu względem odległych bodźców z pokoju. Po kilkuminutowym odroczeniu rozpoczyna się próba testowa, w której podczas treningu nie podaje się szoków.

W przeciwieństwie do poprzednio opisanych testów, dla wyuczenia szczura zasad testu, Test Unikania Miejsca nie wymaga przeprowadzania wcześniejszego treningu. Szczur swobodnie chodzi po niewielkiej arenie i szybko natrafia na miejsce, które jest wyróżnione przez podawanie szoków. Miejsce to stanowi szóstą część areny. Po kilku wejściach, korzystając z użytecznych odległych i/lub bliskich bodźców zwierzę zaczyna unikać tego miejsca. Test pozwala również na badanie zdolności do zapamiętania reguł testu. W tym celu oblicza się współczynnik: liczba szoków do liczby wejść na miejsce z szokiem. Niska wartość współczynnika wskazuje, iż szczur kojarzy wejście na wyróżnione miejsce z szokami i szybko reaguje zejściem z tego obszaru areny. Natomiast pomiar przebytej przez szczura drogi ma ścisły związek z ruchliwością, co pozwala określić stan fizjologiczny zwierzęcia. Pomiar ten jest szczególnie ważny podczas testowania leków psychoneurologicznych i w badaniach strukturalnych mózgu.

Test Unikania Miejsca, w przedstawionych powyżej wariantach, został zastosowany między innymi w badaniach strukturalnego podłoża pamięci przestrzennej (uszkodzenia wybranych struktur mózgu), do oceny wpływu encefalopatii wątrobowej na procesy poznawcze, w modelu schizofrenii, oraz pamięci operacyjnej po prądowej stymulacji mózgu. Otrzymane wyniki behawioralne potwierdziły jego przydatność w powyższych badaniach.

Podsumowując, Test Unikania Miejsca wraz z pozostałymi testami na pamięć przestrzenną stanowią doskonałą bazę nie tylko dla badań podstawowych nad funkcjonowaniem układu nerwowego, ale również przedklinicznych badań farmakologicznych.

## **The study of cognitive behavior in a rat behavioral model**

M. WEŚIERSKA

*Nencki Institute Of Experimental Biology, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland*

The everyday proper functioning of humans and animals dependent on perception and collection of information derived from stimuli of different modalities. This ability is called memory. The result of memory and the cognitive processes which accompany them support human and animal activity in the present and future. The processes occur in the central nervous system, where information about stimuli are transformed into memory traces and hidden in such a form, which allows the possibility for later use it, when sources of primary stimuli will be absent.

Memory is classified according to stimuli modality (visual, auditory, gustatory or tactile memory), time span of memory functioning (short – or long term memory) and function, in which memory is engaged. According to the last classification the two classes of memory, declarative and nondeclarative, are distinct. Declarative memory, also called explicit memory, requires consciousness, whereas nondeclarative memory, or implicit memory, functions without it and supports skill behavior.

Knowledge about memory function and cognitive processes is needed to address disorders of the central nervous system disorder, such as Alzheimer's disease, schizophrenia or depression. Also such knowledge is used to enhance memory in healthy subjects, e.g. to improve learning processes.

Mechanisms which are underlying memory function and cognitive processes are studied in animal models of behavior. The laboratory rat is commonly used in such models. In these models animals respond to a conditioned stimulus or stimuli and this response is taken as equivalent to human responses. Manipulation of experimental conditions like stimuli parameters, or of physiology of the nervous system using pharmacological treatment can influence behavioral responses. This could be expressed, for example, as change in the number of responses, duration of responses or behavioral strategy. All these response parameters are useful to estimate memory function.

To study declarative memory, which is common for animals and humans, behavioral tests of spatial memory are used. The more popular ones are maze – like tests: the Olton radial arm maze, the Y – maze, the T – maze, the hole – board test and the Morris water maze. A proper response in the dry maze tests is the exploration of non – visited arms to find food at the end of a given arm (a target place). In a hole – board test the rat should find the hole on an

arena, in which food is presented or omitted. In the water maze the rat should find a small platform, which is hidden under water (by swimming to it fast and with a direct trajectory). All presented tests start with pre – training sessions, in which an animal learns a rule of how to respond, e.g. to find food or a platform. It requires several trials of repetition in the same experimental conditions and often this training lasts a week or longer. In the proper training the food or the platform is presented in the other arms or target location. The main indexes of memory are a low number of errors (i.e. – few visits to the wrong hole or location in the water tank) and short response times.

A new test to study spatial memory is a place avoidance test. In this test the task of the rat is to remember and avoid entering into a place on the arena where shocks are given. The location of this place could be described by distal and/or proximal stimuli from different modalities and information from the self – motion. Different variants of the place avoidance test allow for the study both kinds of spatial memory: allothetic and idiothetic memory. Allothetic memory is based on distal information, which is mainly visual stimuli, whereas idiothetic memory is based on information from self – motion and from proximal stimuli.

During subsequent stages of the experiment different variants of the place avoidance test not only to include both kinds of spatial memory but also to evaluate cognitive coordination and plasticity processes. Cognitive coordination is based on processes which demand stimuli segregation. It allows a rat on a rotating arena to avoid a place with shock which is at a fixed position relative to distal visual stimuli located in a lit room. On the contrary, cognitive plasticity allows rats to use previously misleading stimuli as relevant stimuli. Such situations happens when the first spatial representation demands segregate relevant distal room stimuli in the presence of misleading arena and self – motion stimuli (allothetic memory). The previously irrelevant stimuli may become relevant for formation of the second representation (idiothetic memory). The repeated presentation of a to – be – avoided place in a fixed location on the arena is useful to test reference memory, whereas a daily change of place location is utilized to study working memory processes and executive function. To study this a rat is trained in one short session to learn to avoid a place where shocks are administered. Then, after delay without training, the rat is again introduced into the arena and the test for recovery of memory is initiated. Over consecutive working memory sessions the to – be – avoided place is fixed according to a new room frame reference relative to distal, visual stimuli from the room.

Contrary to the previously described maze – like tests, in the place avoidance test rats learn to perform the task without an early pre – training. The rat is freely walking on the arena and by



chance encounters the location with shocks, which represents a one of six part of the arena surface. After fever entrance and shocks, the rat starts to escape the place once it feels shocks. A rat's ability to remember the rule of this test allows for the study of not only declarative, but also procedural memory. For this, measurement of the shock/entrance ratio is calculated. A low ratio expresses good skill behavior. The total path length walked by rats during a session, which is closely related to the animal's activity level, expresses the physiological state of the organism. Information about spontaneous locomotion is particularly important in a pharmacological study and relevant for studies of brain structures. The place avoidance test, in all of the presented variants, was utilized to study the structural basis of both kinds spatial memory, allothetic – and idiothetic, evaluate the effects of brain damage in hepatic encephalopathy on function, a model of schizophrenia, as well as working memory combined with brain current stimulation. The obtained results confirmed that the place avoidance test is a useful and precise tool to study higher level brain function.

In conclusion, the place avoidance test together with other spatial memory tests are fundamental methods not only for basic research of brain function but also from preclinical pharmacological studies.

## **Badanie uczenia się i pamięci u szczurów i myszy**

E. KNAPSKA

*Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M.Nenckiego, Warszawa*

W badaniu mózgowego podłoża uczenia się i pamięci stosuje się różnorodne testy behawioralne. W czasie mojego wykładu zaprezentuje kilka przykładów testów, których używamy do badania obwodów neuronalnych zaangażowanych w procesy uczenia się i pamięci.

(I) Klasyczne warunkowanie strachu i jego modyfikacje.

(1) Modele zaburzeń lękowych i terapii behawioralnej.

Klasyczne warunkowanie reakcji strachu polega na wytworzeniu asocjacji pomiędzy bodźcem początkowo obojętnym, np. dźwiękiem (bodziec warunkowy), a awersyjnym bodźcem o istotnym znaczeniu biologicznym, na który zwierzę reaguje strachem, np. drażnienie łap prądem elektrycznym (bodziec bezwarunkowy). W wyniku wytworzenia takiej asocjacji zwierzę zaczyna reagować strachem w odpowiedzi na bodziec warunkowy, któremu nie towarzyszy bodziec bezwarunkowy. Strach u gryzoni jest łatwo obserwowalny i mierzalny w postaci reakcji zamierania (widocznej jako całkowity bezruch zwierzęcia), podwyższonego ciśnienia krwi, wzrostu akcji serca, uwalniania hormonów stresowych, wzmożonego odruchu wzdrygnięcia oraz obniżonej reaktywności na bodźce bólowe. Pamięć strachu jest długotrwała, a jej przejawy są obserwowane niezależnie od kontekstu doświadczalnego. Jednakże uwarunkowana reakcja strachu może zostać zmniejszona, a nawet wyeliminowana, poprzez wielokrotną prezentację bodźca warunkowego, któremu nie towarzyszy bodziec bezwarunkowy. Wygaszanie reakcji strachu jest aktywnym procesem uczenia się i polega raczej na modyfikacji istniejącego śladu pamięciowego niż na jego wymazywaniu. Reakcja strachu jest hamowana, ale nie eliminowana, o czym świadczą zjawiska odnawiania reakcji strachu czy spontanicznego powracania reakcji strachu wraz z upływem czasu. Warunkowanie i wygaszanie reakcji strachu są uznawane za modele powstawania i terapii zaburzeń lękowych. Odnawianie reakcji strachu pokazuje zależność procesu wygaszania od kontekstu doświadczalnego, pozwala też zrozumieć, dlaczego terapia lękowa często okazuje się nieskuteczna.

(2) Strach przekazywany społecznie.

Wiadomo, że emocje uczestniczą w regulacji zachowań społecznych oraz że stan emocjonalny jednego osobnika wpływa na zachowania innych osobników tego samego gatunku. Zaprojektowany przez nas model strachu przekazywanego społecznie pozwala badać

mózgowe podłoże transferu emocji. W modelu tym szczury są hodowane w parach. Jeden osobnik z każdej pary jest przypisywany do grupy „nadawców” i poddawany klasycznemu warunkowaniu strachu albo ekspozycji na nową dla niego klatkę doświadczalną, bez prezentacji żadnych nieprzyjemnych bodźców (grupa kontrolna). Następnie szczury „nadawcy” powracają do klatki domowej, gdzie czeka na nich naiwny partner („obserwator”). Badane są efekty interakcji pomiędzy nadawcami i odbiorcami na zachowanie i aktywność mózgu odbiorców. Wykorzystując ten model oraz dwa rodzaje treningu o charakterze obronnym (dwukierunkową reakcję unikania oraz klasyczne warunkowanie reakcji strachu) wykazaliśmy, że krótka interakcja z wystraszoną partnerem, która ma miejsce przed treningiem poprawia uczenie się i pamięć mierzoną następnego dnia.

## (II) System IntelliCage i jego modyfikacje

### (1) Uczenie się motywowane apetytywnie i awersyjnie w klatce IntelliCage.

Klatka IntelliCage służy do w pełni zautomatyzowanych obserwacji spontanicznego zachowania oraz uczenia się myszy hodowanych w grupach. Wprowadzenie pełnej automatyzacji umożliwiło wyeliminowanie dwóch najpoważniejszych źródeł stresu występujących w klasycznych testach zachowania: stresu związanego z obecnością osoby badającej oraz stresu wynikającego z izolacji społecznej. System urządzeń składających się na klatkę eksperymentalną został umieszczony w standardowej klatce używanej do hodowli szczurów. W skład wyposażenia pojedynczej klatki doświadczalnej wchodzi 4 podjednostki służące treningowi instrumentalnemu. Mają one kształt graniastosłupa i mieszczą się w rogach klatki. Dostęp do każdego rogu zapewnia rurka mogąca pomieścić jednocześnie tylko jedno zwierzę. Antena zamontowana w rurce pozwala na identyfikację myszy wchodzącej do rogu. Identyfikacja jest możliwa dzięki transponderowi wszczepionemu pod skórą na karku. Transponder ten emituje w polu magnetycznym kod specyficzny dla danej myszy. Wewnątrz każdego rogu znajdują się dwa otwory prowadzące do butelek z wodą. Otwory te są wyposażone w fotodetektory rejestrujące reakcję włożenia nosa, wykorzystywaną jako reakcja instrumentalna u myszy. Dostęp do butelek z wodą może zostać zamknięty za pomocą metalowych bramek poruszanych silnikami. System IntelliCage stwarza także możliwość zastosowania bodźców awersyjnych w postaci dmuchnięć powietrza skierowanych w stronę głowy zwierzęcia. System IntelliCage jest kontrolowany przez komputer, który rejestruje również liczbę wizyt, reakcji włożenia nosa oraz liźnięć wykonanych w poszczególnych rogach przez każdą mysz. System sterujący klatkami zapewnia możliwość podawania wzmocnień pozytywnych (otwierając bramki blokujące dostęp do wody po wykonaniu reakcji włożenia nosa przez mysz) oraz negatywnych

(aplikując dmuchnięcie powietrza po wejściu zwierzęcia do rurki prowadzącej do określonego rogu). W obrębie tej samej klatki wzmocnienia mogą być podawane według schematów zaprogramowanych oddzielnie dla każdego ze zwierząt, w zależności od jego przynależności do określonej grupy doświadczalnej. System IntelliCage jest szczególnie przydatny do określania fenotypu myszy z delecją określonych genów lub zwierząt transgenicznych. Używając tego systemu można przeprowadzać trening motywowany apetytywnie, jak i awersyjnie. W treningu motywowanym apetytywnie myszy kojarzą dostępność słodkiej wody z jednym z rogów doświadczalnych (uczenie się preferencji miejsca), natomiast w treningu awersyjnym zwierzęta uczą się unikać rogu, w którym otrzymują dmuchnięcia sprężonego powietrza (uczenie się unikania miejsca). Innym możliwym wariantem treningu jest uczenie się różnicowania pomiędzy dwoma butelkami umieszczonymi w tym samym rogu (np. pomiędzy słodką wodą lub roztworem chininy a czystą wodą). System ciągłej rejestracji zachowania pozwala także na śledzenie okresowych zmian w zachowaniu.

## **Studies of learning and memory in rats and mice**

E. KNAPSKA

*Department of Neurophysiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw*

Different behavioral tasks are applied to study brain mechanisms of learning and memory. In my lecture, I will present a few examples of different behavioral tests which we use to elucidate neuronal circuits underlying learning and memory.

(I) Pavlovian fear conditioning and its modifications.

(1) Models of anxiety disorders and exposure therapy.

Pavlovian fear conditioning offers a simple model of associative aversive learning. In this type of learning, rats learn to fear a conditional stimulus (CS), e.g. a tone, which has been paired with an aversive unconditional stimulus (US), e.g. a footshock. Conditioned fear can be observed as conditioned fear responses, including increases in blood pressure and heart rate, the release of stress hormones, heightened acoustic startle, anesthesia, and freezing. Fear memories are long lasting and generalize broadly to many contexts. Conditioned fear can, however, be reduced by repeated presentation of the CS in the absence of the US. There is substantial evidence that this process, termed extinction, involves new learning rather than erasure of the original fear memory and that it is, unlike fear conditioning, highly context – dependent. One of the most fundamental and impressive phenomena which suggest an important role for context in extinction is the recovery of extinguished fear as a result of a change in experimental context (renewal effect). Clinical anxiety disorders and exposure therapy for anxiety disorders are most often modeled in the laboratory with the use of fear conditioning and extinction, respectively. Paradigm of renewal of conditioned fear offers an opportunity to understand why the exposure therapy sometimes fails.

(2) Socially transferred fear.

It is well known that emotions participate in the regulation of social behaviors and that the emotion displayed by a conspecific influences the behavior of other animals. We designed an experimental rat model of socially transferred fear to study the neural mechanisms underlying emotional transfer. In this model, the rats are kept in pairs, and one animal (“demonstrator”) is subjected to specific behavioral training of either foot – shock reinforced context conditioning or just exposure to a novel context. Then the demonstrator interacts with their cagemates (“observers”) and the results of interaction are studied. Using this model and two types of aversive learning (shock – motivated shuttle avoidance task and Pavlovian fear

conditioning) we found that a brief social interaction with a recently fear conditioned partner immediately before the training increases learning rate measured on the next day.

(II) IntelliCage system and its modification.

(1) Appetitive and aversive learning in the IntelliCage system.

The IntelliCage is a fully automated system that assesses learning in mice living in social groups. In the IntelliCage the animals are housed and tested 24/7. This allows for eliminating two main factors disturbing mouse behavior in standard tests, namely human presence and isolation. The system is located inside of a large standard rat cage. In the corners of the housing cage are four operant learning chambers. Mice have access to the chamber provided *via* a tubular antenna reading the transponder codes. The transponder is implanted subcutaneously to enable single animal identification. Only a single mouse has access to one learning chamber at the same time. The chamber, equipped with a proximity sensor, contain two openings that permit access to the spouts of drinking bottles. These openings are crossed by beams of IR waves, which allow to record nosepoke responses. Access to the bottles is blocked by small motorized doors. Aversive stimulation is delivered in the form of an air – puff directed at the head of the mouse through tubing controlled by electric valves. The IntelliCage system is controlled by a computer that recognizes visits, nosepokes, and tube – lickings of the individual mice and deliver rewards (by opening access to the water after a nosepoke) or punishments (by entering the test chamber) according to preprogrammed schedules depending on the assignment of the mice to different test groups within the same cage. The IntelliCage system is especially useful for high – throughput testing of knockout and transgenic mice. By using the IntelliCage system, we are able to carry out both appetitively and aversively motivated training. In appetitive training, the mice associate sweetened water with a specific corner of the cage (i.e., conditioned place preference), whereas in aversive training, the mice learn to avoid a corner where air – puffs are administered (i.e., conditioned place avoidance). The discrimination paradigms between two drinking bottles are also possible (e.g., sweetened water or quinine solution vs tap water). Moreover, continuous testing enables us to follow periodic changes in behavior.

## Zwierzęta gospodarskie w badaniach behawioralnych

I. ZWOLIŃSKA – BARTCZAK

*Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,  
Ul. Kożuchowska 7; 51 – 631 Wrocław; e – mail: [irena.bartczak@up.wroc.pl](mailto:irena.bartczak@up.wroc.pl)*

Człowiek zawsze interesował się zachowaniem zwierząt, także zwierząt domowych, czy gospodarskich. Jako przykład może posłużyć opis hierarchii społecznej u bydła, dokonany przez Arystotelesa (Liebenberg i wsp., 1971). Cechy behawioralne miały znaczenie w udomawianiu zwierząt. W klasycznym podręczniku Hafeza (1975) podkreślono znaczenie zachowania się zwierząt jako istotnego czynnika w procesie domestykacji, a także przytoczono teorie dotyczące związku zmian zachowania się zwierząt i domestykacji. Dotyczą one większej plastyczności behawioralnej zwierząt udomowionych w porównaniu do dziko żyjących, a także ich lepszej zdolności uczenia się; nienaturalnych warunków, w jakich przeprowadza się testy behawioralne; inna z kolei teoria mówi o ograniczeniu form behawioralnych u zwierząt udomowionych. Hafez (1975) wyraził pogląd, że zachowania udamawianych gatunków uległy zmianie w tym procesie.

Liczne badania nad zachowaniem się zwierząt gospodarskich dotyczyły genetycznego uwarunkowania cech behawioralnych i możliwości poddania ich pracy hodowlanej, a zwłaszcza selekcji. W celu określenia poziomu zmienności genetycznej w populacji dokonywano oszacowań odziedziczalności ( $h^2$ ) wielu cech behawioralnych zwierząt gospodarskich. Przykładem może być odziedziczalność zachowań lokomocyjnych cieląt – czas trwania cwału, wynosząca 0.97 (Robbins i wsp., 1987), neofobii pokarmowej u krów:  $h^2=0.16$  (Zwolińska – Bartczak i wsp., 2004), oceny libido tryków różnych ras:  $h^2=0.17$  – 0.31 (Snowder i wsp., 2004), czy przejawiania zaufania do ludzi przez młode lisy:  $h^2=0.20$  w Finlandii i  $h^2=0.12$  w Norwegii (Kenttämies i wsp., 2002). Selekcja cech behawioralnych zwierząt gospodarskich prowadzona była już w czasie procesu udomawiania, gdy do dalszej hodowli wybierano zwierzęta charakteryzujące się łagodnością. Celem pracy hodowlanej była korzyść hodowcy – osiągnięcie wysokiego poziomu użytkowości, a nie zachowanie wszystkich form behawioralnych – przykładem może być wyeliminowanie kwoczenia (zachowania macierzyńskiego, niezbędnego z biologicznego punktu widzenia) u kur leghorn, co podniosło wydajność nieśną kur tej rasy (Nowicki i Zwolińska – Bartczak, 1983), czy ułatwienie w pracy ze zwierzętami – na przykład zwiększenie ufności lisów w stosunku do ludzi (Kenttämies i wsp., 2002).

Badania behawioralne zwierząt gospodarskich koncentrowały się na wielu formach zachowań; wielu autorów zajmowało się m.in. przejawami zachowań seksualnych samców

i samic zwierząt gospodarskich (np. Orihuela, 2000), zachowaniem się samców podczas pobierania nasienia, ponieważ sztuczne unasiennianie w hodowli zwierząt gospodarskich jest szeroko stosowaną metodą, zachowaniami związanymi z opieką nad potomstwem, zachowaniem się zwierząt utrzymywanych wyłącznie w pomieszczeniach inwentarskich, a także na pastwisku, zachowaniem się przy pobieraniu paszy, czy przejawianiem zachowań agresywnych (np. Geverink i wsp., 2002; Estevez i wsp., 2003).

Problem zachowań socjalnych, zwłaszcza związanych z tworzeniem i zmianami w hierarchii jest szczególnie ważny, ponieważ zwierzęta gospodarskie należą do gatunków stadnych, a metody utrzymania wiążą się z częstymi przegrupowaniami osobników (np. Coutellier i wsp., 2007; Raussi i wsp., 2010).

Dużo uwagi poświęca się narażeniu zwierząt gospodarskich na stres m.in. podczas transportu (Key i Hall, 2009; Valros i wsp., 2008) a także zachowaniu się zwierząt chorych. Niejednokrotnie na podstawie zmian w zachowaniu się zwierzęcia można wnioskować o wystąpieniu zachorowania; obserwacje behawioralne stanowią pomoc zarówno dla hodowców, jak i lekarzy weterynarii (Siivonen i wsp., 2011).

W ostatnich latach zmienił się kierunek w badaniach behawioralnych zwierząt gospodarskich. Problem dobrego samopoczucia zwierząt, osiągnięcia przez nie dobrostanu stał się ważny (np. Watts i Stookey, 2000; Hagen i Broom, 2004). Dotyczy to zarówno warunków utrzymania zwierząt gospodarskich, jak i pracy z nimi; coraz powszechniejsze są metody naturalne, oparte na znajomości zachowań zwierząt (np. Miller, 2007), wykorzystywane podczas ich uczenia i współpracy z człowiekiem. Obecnie większość hodowców zwraca uwagę nie tylko na wydajność zwierząt gospodarskich, ale też stara się zapewnić im wygodę, a eliminować dyskomfort.

## BIBLIOGRAFIA

- COUTELLIER L., ARNOULD C., BOISSY A., ORGEUR P., PRUNIER A., VEISSIER I., MEUNIER – SALAÜN M – C., 2007: *Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing – finishing period*. Appl. Anim. Beh. Sci. 105, 102 – 114
- ESTEVEZ I., KEELING L.J., NEWBERRY R.C., 2003: *Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl*. Appl. Anim. Beh. Sci. 84, 213 – 218
- GEVERINK N.A., SCHOUTEN W.G.P., GORT G., WIEGANT V.M., 2002: *Individual differences in aggression and physiology in peri – pubertal breeding gilts*. Appl. Anim. Beh. Sci. 77, 43 – 52
- HAFEZ E.S.E., 1975: *The Behaviour of Domestic Animals*. Baillière Tindall, London
- HAGEN K., BROOM D.M., 2004: *Emotional reactions to learning in cattle*. Appl. Anim. Beh. Sci. 85, 203 – 213
- KAY R., HALL C., 2009: *The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer*. Appl. Anim. Beh. Sci. 116, 237 – 243



- KENTTÄMIES H., VALBERG NORDRUM N., BRENØE U.T., SMEDS K., RUNE JOHANNESSEN K., BAKKEN M., 2002: *Selection for more confident foxes In Finland and Norway: Heritability and selection response for confident behaviour In blue foxes (Alopex lagopus)*. Appl. Anim. Beh. Sci. 78, 67 – 82.
- LIEBENBERG O., LAUBE R.B., PORZIG E., 1971: *Einige Mitteilungen über historisch bedeutsame ethologische Beobachtungen am Rind (Bos Taurus L.)*. Arch. Tierz. 14, 109 – 127.
- MILLER R.M., 2007: *Jeździectwo naturalne bez tajemnic. Z serca prosto do rąk*. Agencja PDM, Warszawa
- NOWICKI B., ZWOLIŃSKA – BARTCZAK I., 1983: *Zachowanie się zwierząt gospodarskich*. PWRiL, Warszawa
- ORHUELA A., 2000: *Some factors affecting the behavioural manifestation of estrus In cattle: a review*. Appl. Anim. Beh. Sci. 70, 1 – 16
- RAUSSI S., NISKANEN S., SIIVONEN J., HÄNNINEN L., HEPOLA H., JAUHAINEN L., VEISSIER I., 2010: *The formation of preferential relationships at early age In cattle*. Beh. Proc. 84, 726 – 731
- ROBBINS R.D., MCGLONE J.J., MORROW J.L., LONG R.A., 1987: *Heritability estimates of open field behaviours using split – embryo identical twins calves*. J.Anim.Sci., 65, 28 – 30.
- SIIVONEN J., TAPONEN S., HOVINEN M., PASTELL M., LENSINK B.J., PYÖRÄLÄ S., HÄNNINEN L., 2011: *Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour*. Appl. Anim. Beh. Sci. 132, 101 – 106
- SNOWDER G.D., STELLFLUG J.N., VAN VLECK L.D., 2004: *Genetic correlation of ram sexual performance with ewe reproductive traits of four sheep breeds*. Appl. Anim. Beh. Sci. 88, 253 – 261.
- VALROS A., VUORENMAA R., JANCZAK A.M., 2008: *Effect of simulated long transport on behavioural characteristics In two strains of laying hen chicks*. Appl. Anim. Beh. Sci. 109, 58 – 67
- WATTS J.M., STOOKEY J.M., 2000: *Vocal behaviour In cattle: the animal's commentary on its biological processes and welfare*. Appl. Anim. Beh. Sci. 67, 15 – 33
- ZWOLIŃSKA – BARTCZAK, I., MUNKSGAARD, L., LØVENDAHL, P., 2004: *Genetic variability of behavioural traits associated with novel food in Holstein dairy cattle*. CD communication: Abstracts of the XXI Genetic Days, 1 – 3 September 2004, GH15, ISBN 83 – 89189 – 39 – 9, Agricultural University of Wrocław, 2 pp.

## **Behavioural studies in farm animals**

I. ZWOLIŃSKA – BARTCZAK

*Department of Genetics and Animal Breeding, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Kożuchowska 7; 51 – 631 Wrocław; e – mail: irena.bartczak@up.wroc.pl*

Human has always been interested in animals behaviour, as well as in domestic and farm animals' behaviour. Description of social hierarchy in cattle made by Aristoteles can be used as an example (Liebenberg et al., 1971). Behavioural traits had an importance in the domestication process of animals. In the classical handbook by Hafez (1975) the meaning of animals' behaviour as an important factor in domestication process was emphasized and also theories on relation of changes in animals' behaviour and domestication were quoted. They concerned greater behavioural plasticity in domesticated animals and being superior in learning in contrast to wild animals; unnatural conditions of behavioural tests; another theory said that behavioural forms in domesticated animals were inferior according to natural species. Hafez (1975) concluded changes in behaviour of species during domestication process.

Many studies have dealt with genetic background of behavioural traits and possibility to use them in breeding work especially in selection. Heritabilities ( $h^2$ ) of many behavioural traits in farm animals were estimated to determine the level of genetic variability in population. For instance, heritability of locomotion behaviour in calves – duration of canter was 0.97 (Robbins et al., 1987), neophobia to novel food in cows:  $h^2=0.16$  (Zwolińska – Bartczak et al., 2004), sexual performance score in rams of different breeds:  $h^2=0.17 – 0.31$  (Snowder et al., 2004) or confidence of young foxes towards humans:  $h^2=0.20$  in Finland and  $h^2=0.12$  in Norway (Kenttämies et al., 2002). Selection of behavioural traits in animals was used during domestication process when for parents of next generation gentle animals were chosen. High level of animals' performance giving profit for breeder (not protection of all behavioural forms) was the aim of breeding work. The elimination of hatching behaviour (important from biological point of view) in Leghorn hens increasing egg lying was a good example (Nowicki and Zwolińska – Bartczak, 1983). Another aim was an improvement of animals' maintenance – for instance to have foxes more confident towards humans (Kenttämies i wsp., 2002).

Behavioural studies in farm animals focused on many behaviour forms; some authors were interested in sexual behaviour of males and females (eg Orihuela, 2000); behaviour of males during semen collection, because artificial insemination is popular method in farm

animals' breeding; maternal behaviour, behaviour of animals kept inside and on the pasture; feeding behaviour and aggressive behaviour (eg Geverink et al., 2002; Estevez et al., 2003).

Farm animals belong to social species, so problem of social behaviour connected with creation of the hierarchy and hierarchy changes is especially important because of frequent regrouping in used maintenance methods (eg Coutellier et al., 2007; Raussi et al., 2010).

The big attention is given to risk of stress in farm animals' breeding particularly during transport (Key and Hall, 2009; Valros et al., 2008) and also to behaviour of sick animals. On base of changes in animal behaviour we can learn about disease incidence; behavioural observations are helpful for breeders as well as veterinarians (Siivonen et al., 2011).

Trend in behavioural investigations of farm animals was changed recently. Problem of animals' comfort, achievement of welfare has become important (eg Watts and Stookey, 2000; Hagen and Broom, 2004). It concerns keeping conditions of farm animals as well as work with them. The natural methods based on the knowledge of animals behaviour (eg Miller, 2007) are increasingly common and use in training of animals and their cooperation with human. Now the most of breeders pay attention not only on productivity of farm animals but they also try to assure comfort to them and eliminate discomfort.

## REFERENCES

- COUTELLIER L., ARNOULD C., BOISSY A., ORGEUR P., PRUNIER A., VEISSIER I., MEUNIER – SALAÜN M – C., 2007: *Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing – finishing period*. Appl. Anim. Beh. Sci. 105, 102 – 114
- ESTEVEZ I., KEELING L.J., NEWBERRY R.C., 2003: *Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl*. Appl. Anim. Beh. Sci. 84, 213 – 218
- GEVERINK N.A., SCHOUTEN W.G.P., GORT G., WIEGANT V.M., 2002: *Individual differences in aggression and physiology in peri – pubertal breeding gilts*. Appl. Anim. Beh. Sci. 77,43 – 52
- HAFEZ E.S.E., 1975: *The Behaviour of Domestic Animals*. Baillière Tindall, London
- HAGEN K., BROOM D.M., 2004: *Emotional reactions to learning in cattle*. Appl. Anim. Beh. Sci. 85, 203 – 213
- KAY R., HALL C., 2009: *The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer*. Appl. Anim. Beh. Sci. 116, 237 – 243
- KENTTÄMIES H., VALBERG NORDRUM N., BRENØE U.T., SMEDS K., RUNE JOHANNESSEN K., BAKKEN M., 2002: *Selection for more confident foxes In Finland and Norway: Heritability and selection response for confident behaviour In blue foxes (Alopex lagopus)*. Appl. Anim. Beh. Sci. 78, 67 – 82.
- LIEBENBERG O., LAUBE R.B., PORZIG E., 1971: *Einige Mitteilungen über historisch bedeutsame ethologische Beobachtungen am Rind (Bos Taurus L.)*. Arch. Tierz. 14, 109 – 127.
- MILLER R.M., 2007: *Jeździectwo naturalne bez tajemnic. Z serca prosto do rąk*. Agencja PDM, Warszawa

- NOWICKI B., ZWOLIŃSKA – BARTCZAK I., 1983: *Zachowanie się zwierząt gospodarskich*. PWRiL, Warszawa
- ORHUELA A., 2000: *Some factors affecting the behavioural manifestation of estrus In cattle: a review*. Appl. Anim. Beh. Sci. 70, 1 – 16
- RAUSSI S., NISKANEN S., SIIVONEN J., HÄNNINEN L., HEPOLA H., JAUHAINEN L., VEISSIER I., 2010: *The formation of preferential relationships at early age In cattle*. Beh. Proc. 84, 726 – 731
- ROBBINS R.D., MCGLONE J.J., MORROW J.L., LONG R.A., 1987: *Heritability estimates of open field behaviours using split – embryo identical twins calves*. J.Anim.Sci., 65, 28 – 30.
- SIIVONEN J., TAPONEN S., HOVINEN M., PASTELL M., LENSINK B.J., PYÖRÄLÄ S., HÄNNINEN L., 2011: *Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour*. Appl. Anim. Beh. Sci. 132, 101 – 106
- SNOWDER G.D., STELLFLUG J.N., VAN VLECK L.D., 2004: *Genetic correlation of ram sexual performance with ewe reproductive traits of four sheep breeds*. Appl. Anim. Beh. Sci. 88, 253 – 261.
- VALROS A., VUORENMAA R., JANCZAK A.M., 2008: *Effect of simulated long transport on behavioural characteristics In two strains of laying hen chicks*. Appl. Anim. Beh. Sci. 109, 58 – 67
- WATTS J.M., STOOKEY J.M., 2000: *Vocal behaviour In cattle: the animal's commentary on its biological processes and welfare*. Appl. Anim. Beh. Sci. 67, 15 – 33
- ZWOLIŃSKA – BARTCZAK, I., MUNKSGAARD, L., LØVENDAHL, P., 2004: *Genetic variability of behavioural traits associated with novel food in Holstein dairy cattle*. CD communication: Abstracts of the XXI Genetic Days, 1 – 3 September 2004, GH15, ISBN 83 – 89189 – 39 – 9, Agricultural University of Wrocław, 2 pp.

## **Wpływ relacji człowiek – zwierzę na dobrostan zwierząt**

J. EL-JAI

*III Lokalna komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, julita.eljai@gmail.com*

Dobrostan zwierząt jest zagadnieniem złożonym, interdyscyplinarnym i wymykającym się jednej definicji. Wyróżnić możemy m.in. definicję opisową odnoszącą się do koncepcji „Pięciu Wolności”, definicję odnoszącą się do harmonii ze środowiskiem, adaptacji czy subiektywnych doświadczeń. Uwzględniając stanowisko zarówno nauk biologicznych, jak i humanistycznych, można wstępnie przyjąć, że jest to subiektywny stan jednostki względem jej wewnętrznego i zewnętrznego środowiska, osiągnięty na podstawie poznawczych i emocjonalnych procesów (Fraser 2008). Bez względu na to, czy będziemy odnosić się do biologicznego funkcjonowania zwierzęcia, jego stanu emocjonalnego czy naturalnych warunków utrzymania umożliwiających realizację specyficznych zachowań zwierzęcia, należy podkreślić rolę interakcji pomiędzy zwierzęciem a człowiekiem. Interakcja ta może mieć odmienny rodzaj, częstotliwość i jakość. Zwierzę, odczuwając te relacje jako pozytywne bądź negatywne, będzie je przekładać na przyszłe interakcje z człowiekiem.

Problematyka dobrostanu zwierząt jest jednym z głównych obszarów zainteresowania etyki ochrony zwierząt, etyki środowiskowej czy etyki żywnościowej. Relacje człowiek – zwierzę zależą od przyjętych podstaw filozoficznych, religijnych i kulturowych. Człowiek jako podmiot moralny ma pewne obowiązki wobec przedmiotów relacji moralnej, jakimi są zwierzęta. Obowiązek ten sprowadza się w swojej wersji minimalistycznej do nie traktowania zwierząt jako rzeczy, co związane jest z powstrzymaniem się od czynienia umyślnego bólu zwierzętom. Przykładem uzasadniania tego obowiązku może być zdolność odczuwania, inteligencja czy świadomość zwierząt.

Stanowiska określające relacje człowiek – zwierzę w etyce możemy podzielić na antropocentryczne, zoocentryczne i biocentryczne. Wśród stanowiska antropocentrycznego wyróżniamy m.in. wersję laicką (świecką) i chrześcijańską. Wersja chrześcijańska jest stanowiskiem umiarkowanym, gdzie zwraca się uwagę na wartość zwierząt i postuluje rolę człowieka jako opiekuna wszystkich stworzeń. W wersji laickiej mamy często przykłady podejścia skrajnego, które nie przyznaje zwierzętom żadnej wartości i nie nakłada na człowieka obowiązku opiekowania się nimi. W wersji zoocentrycznej postuluje się przyznanie zwierzętom, bądź statusu podmiotów moralnych, które posiadają wartość wewnętrzną i wtedy przyznania im praw (istnieje różnica między zwolennikami przyznania zwierzętom praw oraz tych, którzy postulują ich wysoki dobrostan – Damron 2003, Mellor

i Stafford 2001), bądź uznania ich za istoty czujące, co jest wystarczającym kryterium do nałożenia na człowieka obowiązku niekrzywdzenia w szerokim sensie (zaprzestanie eksperymentów na zwierzętach, przejście na wegetarianizm). W wersji biocentrycznej zwraca się uwagę nie tylko na zwierzęta, ale też cały ekosystem i postuluje się ochronę zwierząt jako równoprawnych członków środowiska. W tym stanowisku najczęściej inaczej traktuje się zwierzęta dzikie, a inaczej zwierzęta należące do antroposfery, co jest też charakterystyczne dla opinii publicznej rozgraniczającej zwierzęta w zależności od ich znaczenia dla człowieka.

Podjęcie kwestii zwierząt należących do antroposfery powinno cechować z jednej strony współczucie, a z drugiej realizm. Dlatego kluczową kwestią jest świadomość relacji człowiek – zwierzę jako zjawiska asymetrycznego (Schiktanz 2004). Zwierzęta laboratoryjne przeznaczone są do doświadczeń, więc ich życie i zdrowie jest zagrożone, w przeciwieństwie do życia i zdrowia eksperymentatora czy opiekuna zwierzętarni. Cel utrzymywania zwierząt wyznacza tym samym ramy ich istnienia. Dlatego, by zapewnić jak najwyższy poziom dobrostanu zwierząt, należy być świadomym naszych ograniczeń z jednej strony, a z drugiej szukać nowych rozwiązań, pozwalających nie tylko zwiększać wskaźniki fizjologiczne, ale też polepszać środowisko zwierząt i ich relacje z pielęgniarzami.

Rola pielęgniarza zwierząt wpływa bezpośrednio na dobrostan zwierząt. Przez wprowadzenie odpowiedniego zachowania, bazującego na empatii, można uzyskać wysoki standard utrzymania zwierząt (Seabrook 1991), a przez to wiarygodniejsze wyniki doświadczenia. Wyróżnić możemy dwa komponenty opieki nad zwierzętami: odgórne (odpowiednie zarządzanie) oraz oddolne (zdolności techniczne, empatyczne i poznawcze pielęgniarza). Do zachowań pielęgniarza polepszających relację człowiek – zwierzę zaliczyć można: zachowanie warunkowe, kontakt psychiczny i fizyczny, identyfikację, spokojne i pewne zachowanie oraz zachowania nieagresywne.

Charakter relacji między zwierzęciem biorącym udział w doświadczeniu a osobą je projektującą, przeprowadzającą, jak i opiekującą się zwierzęciem w trakcie doświadczenia, ma znaczący wpływ na jakość i wyniki przeprowadzanego projektu. Relacje człowiek – zwierzę w obszarze badań na zwierzętach oscylują między podejściem antropocentrycznym skrajnym a umiarkowanym. Świadomość podstaw tych relacji i odpowiednie przeszkolenie w zakresie wpływu zachowania osoby opiekującej się zwierzęciem na dobrostan zwierzęcia są wymogiem nowych standardów unijnych<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, Art. 23, ust. 3: Państwa członkowskie publikują, na podstawie elementów określonych w załączniku V, minimalne wymogi dotyczące kształcenia i szkoleń oraz uzyskiwania,

## BIBLIOGRAFIA

APPLEBY M., *Human-Animal Relationships in a Global Economy*, in: *The Human-Animal Relationship. Forever and a Day*, F. De Jonge, R. van den Bos (eds.), Royal Van Gorcum 2005, pp. 279-287.

DAMRON W.S., *Introduction to Animal Science. Global, Biological, Social, and Industry Perspectives*, Upper Saddle River 2003.

FRASER D., *Understanding animal welfare*, Lavoisier 2008.

MELLOR D.J., STAFFORD K.J., *Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare*, "Australian Veterinary Journal" 79(2001), s. 766 – 767.

SCHIKTANZ S., *Ethical consideration of the human – animal relationship under conditions of asymmetry and ambivalence*, "Journal of Agricultural and Environmental Ethics" 19(2006), s. 7 – 16.

SEABROOK M., *The Human factor – the benefits of humane and skilled stockmanship*, w: *Farm animals: it pays to be a humane*, S.P. Carruthers (red.), Reading 1991.

---

uaktualniania oraz wykazywania wymaganych kompetencji w zakresie funkcji określonych w ust. 2. dotyczący minimalnych wymogów kształcenia i szkoleń, Załącznik V, p. 2: Zasady etyczne dotyczące relacji ludzi ze zwierzętami, niezbywalnej wartości życia i argumentów za wykorzystywaniem i przeciw wykorzystywaniu zwierząt do celów naukowych.

## **The influence of human-animal relation on animal welfare**

J. EL-JAI

*III Local Ethical Committee for Animal Experiments in Warsaw, [julita.eljai@gmail.com](mailto:julita.eljai@gmail.com)*

The concept of animal welfare is a complex and interdisciplinary issue without a unique definition. It can be understood in many different ways (e.g. a descriptive definition referring to “Five Freedoms” concept, a definition focusing on the harmony with the environment, adaptation or subjective experience). Taking into consideration the differing approaches of science and humanities, animal welfare can be provisionally defined as the subjective state of an individual towards its internal and external environment, sustained by cognitive and emotional processes (Fraser 2008). Whenever we refer to biological functioning of the animal, its emotional state or a natural housing system conditioning specific behaviour, the role of human-animal interaction is crucial for animal welfare. The interactions can differ with respect to type, frequency and quality. The animal, perceiving this interaction as positive, neutral or negative, will transpose its attitude on future relations with humans.

The issue of animal welfare is one of the main fields of interest of animal ethics, environmental ethics and food ethics. The relations between humans and animals are closely linked to philosophical, religious and cultural frameworks. Human being as a moral subject has special duties towards the objects of the moral relation (i.e. animals). We cannot treat animals as things and we must not harm them without an overwhelmingly important purpose, because animals have a capacity to feel, they have emotional states, intelligence and cognition.

Human – animal relation can be described from an anthropocentric, zoocentric or biocentric position. Within the anthropocentric mode, we can distinguish between Christian ethics and secular ethics. In modern Christian ethics, the value of animals and the role of a human being as a steward are underlined. Conversely, in hardcore secular ethics, animals have no value or rights and consequently humans have no obligation towards them. In zoocentric (animal ethics) position, animals are perceived as moral subjects with intrinsic value or rights (for the difference between animal rights movements and animal welfare movements – confer Damron 2003; Mellor and Stafford 2001). Because of being sentient beings, animals must not be harmed by humans (e.g. ban on experiments on animals, promotion of vegetarianism). Lastly, the biocentric approach posits that not only animals, but also the whole environment with its ecosystems should be protected. The value of



domesticated animals belonging to anthroposphere and wild animals differs however, and this attitude is characteristic for public opinion in the field of human-animal relationship.

To understand the issue of animals belonging to anthroposphere, we have to adopt an approach that is both realistic and compassionate. The human-animal relation is asymmetrical (Schiktanz 2004). Laboratory animals are bred specifically to be used in experiments, so their life and health can be damaged, as opposed to that of researchers and animals caretakers. The purpose (*telos*) of keeping laboratory animals is the framework of their existence. And because of that, the highest possible animal welfare standards should be adopted, and new ideas that help improve their physiological state, environment and human-animal relation should be proposed.

The role of animal caretakers and technicians in influencing animal welfare is very important. By adopting empathetic behaviour, the caretaker can have a crucial role in creating an environment for improved animal welfare (Seabrook 1991) and in the experiment's output. There are two components recognized in animal care: top-down (management environment) and bottom-up (technical abilities, operative and empathetic behaviour). The crucial behaviors enhancing human-animal relation include: operant conditioning, physical contact, social identification, stability and non-aggressive behaviour.

The quality of the relation between laboratory animal and experiments management (scientists, researchers, animal caretakers and technicians) has a crucial role for the quality of the project. The human-animal relations in the field of laboratory animals science range from extreme anthropocentric attitude to moderate anthropocentric attitude. In the Directive 2010/63/EU, widening the knowledge about the ethical aspects of human-animal relationship, the proper training and education in animal welfare are strongly recommended<sup>3</sup>.

#### REFERENCES

APPLEBY M., *Human-Animal Relationships in a Global Economy*, in: *The Human-Animal Relationship. Forever and a Day*, F. De Jonge, R. van den Bos (eds.), Royal Van Gorcum 2005, pp. 279-287.

---

<sup>3</sup> Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Art. 23(3): Member States shall publish, on the basis of the elements set out in Annex V, minimum requirements with regard to education and training and the requirements for obtaining, maintaining and demonstrating requisite competence for the functions set out in paragraph 2. Annex V, p. 2: Ethics in relation to human-animal relationship, intrinsic value of life and arguments for and against the use of animals for scientific purposes.

DAMRON W.S., *Introduction to Animal Science. Global, Biological, Social, and Industry Perspectives*, Upper Saddle River 2003.

FRASER D., *Understanding animal welfare*, Lavoisier 2008.

MELLOR D.J., STAFFORD K.J., *Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare*, "Australian Veterinary Journal" 79(2001), s. 766 – 767.

SCHIKTANZ S., *Ethical consideration of the human – animal relationship under conditions of asymmetry and ambivalence*, "Journal of Agricultural and Environmental Ethics" 19(2006), s. 7 – 16.

SEABROOK M., *The Human factor – the benefits of humane and skilled stockmanship*, in: *Farm animals: it pays to be a humane*, S.P. Carruthers (red.), Reading 1991.

## **Kiedy prawo nie wystarczy: o wyborach etycznych**

W. PISULA

*Instytut Psychologii, Polska Akademia Nauk, Warszawa*

Jesteśmy świadkami wielkich i szybkich zmian społecznych. Społeczeństwa nie akceptują praktyk wobec zwierząt, które do niedawna wydawały się zupełnie naturalne. Oczywiście, nie ma czegoś takiego jak opinia publiczna "w ogóle". Trzeba przyznać, że problem będzie postrzegany inaczej przez rolników, naukowców zajmujących się badaniem zwierząt, właścicieli zwierząt towarzyszących. Ale jest pewne, że wielkie zmiany zachodzą. Powstaje ważne pytanie: jak instytucje państwowe odpowiedzą na zmiany postaw i oczekiwań społecznych?

Jak wskazywano, (J. Feibleman 1954) organizacja państwa, jako struktura społeczna odpowiada na pojawiające się wyzwania, jako całość.

Istnieje kilka obszarów działalności państwa, które są godne uwagi.

### 1. Wykształcenie:

- Szkoły
- Kształtowanie zachowań konsumenckich
- Stworzenie infrastruktury dla zwierząt domowych

### 2. Akty prawne:

- Ustawodawstwa dotyczącego handlu
- Dobrostanu zwierząt
- Prawna ochrona zwierząt

### 3. Promowanie dobrych praktyk:

Można podać wiele przykładów na to, że rozwój procedur prawnych ma ograniczony wpływ na zachowania człowieka. Ważnym elementem postępu jest i będzie kształtowanie właściwych postaw dotyczących dobrostanu zwierząt.

## **When the law is not sufficient: about the ethical choices**

W. PISULA

*Institute of Psychology, Polish Academy of Sciences*

We are witnessing a great and rapid social change. Society no longer accepts practices against animals that until recently seemed quite natural. Of course, there is no such thing as the general public. We must recognize that the issue will be seen differently by farmers, scientists studying the animals, and the owners of companion animals. But it is certain that the great change is taking place. Important question: how state institutions respond to the great change in attitudes and social expectations?

As it was pointed out by J. Feibleman (1954) state organization, as a social structure responds to the emerging challenges as a whole.

There are several fields of state activity, that are noteworthy.

### 1. Education:

- schools
- shaping consumer behavior
- creating an infrastructure for companion animals

### 2. Legislation:

- trade legislation
- welfare legislation
- legal animal protection

### 3. Promoting good practices:

One may give many examples to show that the development of the legal procedures has limited effect itself. An essential element of progress is and will be shaping the proper customs relating to animal welfare and acceptable treatment of animals.

## **Religie świata wobec cierpienia zwierząt i ludzi**

T. KALETA

*Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach SGGW, 02 – 786 Warszawa,  
ul. Ciszewskiego 8*

Praca ta stawiała sobie dwa cele: zaprezentowanie refleksji autora odnośnie pojęcia cierpienia i próba scharakteryzowania najważniejszych poglądów na nie w wielkich religiach światowych. W literaturze istnieją pewnego typu nieporozumienia dotyczące znaczenia „cierpienia” u zwierząt, traktowanego jak w odniesieniu do ludzi. Czasami także to pojęcie jest raczej błędnie i wąsko identyfikowane z bólem. Autor starał się wyjaśnić te nieporozumienia. Istnienie cierpienia w świecie jest jednym z tematów szeroko dyskutowanych w religiach. Do krótkiego przeglądu wybrano chrześcijaństwo i islam (jako tzw. „religie Księgi”) oraz buddyzm (jako religię „karmiczną”). Jak w żadnej innej religii, w buddyzmie można znaleźć generalnie bardziej integralny i zrównoważony obraz cierpienia u człowieka i zwierzęcia. Przypuszczalnie przyczyna tego tkwi w podstawach filozoficznych tej religii (np. pojęcia karma, dharmy i ahimsy). Chrześcijaństwo i islam jako religie antropocentryczne są wyraźnie skoncentrowane na cierpieniu u człowieka, a ich uwagi dotyczące zwierząt powinny się rozpatrywać bardziej w ramach ogólnego obrazu relacji Boga z człowiekiem.

## **World religions towards the suffering in animal and man**

T. KALETA

*Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, 02 – 786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8*

The purpose of this work was twofold: to present author`s reflections concerning the concept of suffering and an attempt to describe essential views on suffering in big world religions. In the literature there is some misunderstanding concerning the meaning of “suffering” in animal treated as in the man. Sometimes also this notion is rather erroneously narrowly identified with the pain. Author has tried to elucidate this misunderstanding. The existence of suffering in the world is one of the topics widely discussed in the religions. In the short review Christianity and Islam (as so – called “Book religions”) and Buddhism (as “Karmic religion”) were chosen. One can find generally more integral and balanced picture of man and animal suffering in Buddhist than any other religion probably because of philosophical background of this religion (e.g. concepts of “karma”, “dharma” and “ahimsa”). Christianity and Islam as anthropocentric religions are clearly focused on suffering in man and their remarks concerning the animals should be considered more in the framework of God – man relation.

## **Klasyfikacja dotkliwości doświadczeń na zwierzętach i nowa Dyrektywa 2010/63/UE**

J. MACARTHUR CLARK

*Chief Inspector, Animals Scientific Procedures Inspectorate, Home Office, Marsham Street, London SW1P 4DF, UK.*

Nowa dyrektywa Unii Europejskiej w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dyrektywa 2010/63/UE) wprowadza, dla większości krajów członkowskich Unii Europejskiej nowe pojęcie kategoryzacji dotkliwości. Każda z procedur doświadczalnych musi być zakwalifikowana do jednej z czterech kategorii dotkliwości (terminalnej, bez odzyskania przytomności przez zwierzę, łagodnej, umiarkowanej i dotkliwej). Ma to na celu zapewnienie informacji o dotkliwości przy ocenie korzyści i szkód w trakcie procesu wydawania zgody na wykonanie procedur.

W celu zapewnienia lepszego zrozumienia proponowanego systemu Komisja zaprosiła w lipcu 2009 r. grupę ekspertów. Ich zadaniem było opracowanie wskazówek, które obecnie stanowią Załącznik VIII obecnej Dyrektywy. Grupa uznała, że procedurę może stanowić kombinacja jednego lub więcej technicznych działań zastosowanych w stosunku do zwierzęcia, które mogą wywołać u niego ból, cierpienie, dystres lub długotrwałą szkodę. Zgodzono się, że przypisanie do danej kategorii dotkliwości powinno być oparte na najbardziej poważnych skutkach, których może doświadczyć jedno zwierzę po zastosowaniu wszelkich właściwych technik udoskonalenia doświadczenia. W tym sensie kategoria dotkliwości działa jako górna granica dotkliwości, którą dopuszczono jako uzasadnioną przy ocenie szkody – korzyści dokonywanej w trakcie wydawania zgody na realizację projektu.

Należy mieć świadomość, że nie wszystkie zwierzęta muszą doświadczyć przypisanego procedurze poziomu dotkliwości. Jest ważne, by lepiej to rozumieć, a dyrektywa zapewnia to na dwa sposoby. Po pierwsze, przy gromadzeniu danych statystycznych na temat wykorzystania zwierząt uwzględną się wyniki retrospektywnej oceny rzeczywistej dotkliwości doznanej przez zwierzęta. Sposób gromadzenia tych danych jest w fazie uzgodnień. Po drugie, pewna liczba projektów zostanie poddana ocenie retrospektywnej, co umożliwi porównanie rzeczywistej, doświadczanej przez zwierzęta dotkliwości z korzyściami osiągniętymi przez cały projekt.

W prezentacji zostaną rozważone wszystkie te aspekty nowej dyrektywy. Będą też zaproponowane pewne wskazówki na temat kategoryzacji dotkliwości, jak również będzie rozpatrzone pojęcie skumulowanej dotkliwości.

## **Severity Classification and the new Directive 2010/63/EU**

J. MACARTHUR CLARK

*Chief Inspector, Animals Scientific Procedures Inspectorate, Home Office, Marsham Street, London SW1P 4DF, UK.*

The new EU Directive on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU) brings in a concept new to most EU Member States of Severity Classification. One of four severity categories is to be assigned to each procedure: non – recovery, mild, moderate and severe. This is intended to inform the harm – benefit assessment in attempting to justify the procedure.

To aid the understanding of the proposed system, the Commission invited, in July 2009, a group of experts to develop guidance which now forms Annex VIII to the Directive. The group recognised that a procedure may consist of a combination of one or more technical acts carried out on an animal which may cause that animal pain, suffering, distress or lasting harm. It was agreed that the severity category should be assigned based on the most severe effects likely to be experienced by an individual animal after applying all appropriate refinement techniques. In that sense, the severity category acts as a limit on the severity which can be considered to have been justified in the harm – benefit assessment by which the project is authorised.

It should be recognised that not all animals will experience the assigned level of severity. It is important to better understand this and the directive addresses it in two ways. Firstly, the gathering of statistics on the use of animals will include, in a form as yet to be agreed, the recording retrospectively of severity actually experienced by the animals. Secondly, a number of projects will undergo retrospective review in which it should be possible to weigh the actual severity experienced against the benefits achieved by the entire project.

This presentation will consider all these aspects of the new Directive and offer guidance on the categorisation of severity as well as considering the concept of cumulative severity.



## **Niezbędne zmiany w polskim prawie dotyczącym doświadczeń na zwierzętach na skutek uchwalenia nowej dyrektywy 2010/63/UE**

S. KASICKI

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02 – 093 Warszawa*

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych stała się obecnie prawem w Unii Europejskiej. Kraje członkowskie muszą ją przenieść do swego prawa i wdrożyć w życie do 1 stycznia 2013 r. Oznacza to konieczność dostosowania polskich przepisów do postanowień Dyrektywy. Państwa członkowskie mogą utrzymać przepisy krajowe, obowiązujące w dniu 9 listopada 2010 r., służące zapewnieniu szerszej ochrony zwierząt objętych zakresem stosowania dyrektywy niż przepisy w niej zawarte (Art. 2<sup>4</sup>). Jednak muszą o tym powiadomić Komisję przed 1 stycznia 2013 r.

Zgodnie z Art. 1 Dyrektywa ustanawia środki ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. W tym celu określono w niej zasady: a) zastępowania i ograniczania wykorzystywania zwierząt w procedurach oraz doskonalenia warunków hodowli i trzymania zwierząt, opieki nad nimi i wykorzystywania ich w procedurach; b) pochodzenia, hodowli, znakowania i utrzymania zwierząt, opieki nad nimi oraz ich uśmiercania; c) działalności hodowców, dostawców i użytkowników; d) oceny i wydawania pozwoleń na projekty wykorzystujące zwierzęta w procedurach.

Z polskiego punktu widzenia nie zmienia się obszar regulacji dotyczących stosowania doświadczeń na zwierzętach, gdyż Polska objęła je od początku ochroną (Ustawa o ochronie zwierząt). Dyrektywa powiększyła liczbę gatunków kręgowców, które powinny pochodzić ze specjalnych hodowli. Do kręgowców objętych regulacjami dodaje żywe głowonogi, jedynych przedstawicieli bezkręgowców (Art. 1).

Warunki przetrzymywania zwierząt zostały określono szczegółowo dla wielu gatunków zwierząt w Załączniku III (Wymogi dotyczące ośrodków oraz trzymania zwierząt i opieki nad nimi). Wprowadzone w tym załączniku standardy muszą być wprowadzone w życie od 1 stycznia 2017 r., co oznacza wyraźne podniesienie kosztów utrzymywania zwierząt i prowadzenia na nich doświadczeń. Dyrektywa dopuszcza również, pod określonymi warunkami, możliwość prowadzenia doświadczeń na zwierzętach dzikich, należących do gatunków zagrożonych, zwierzętach z rzędu naczelnych, a także zbłąkanych i zdziczałych zwierzętach domowych. Dyrektywa określa dopuszczalne metody uśmiercania zwierząt (Art.

---

<sup>4</sup> Odwołania do artykułów dotyczą Dyrektywy 2010/63/UE.

6) przez opisanie ich w załączniku IV (Metody uśmiercania zwierząt). Dopuszcza jednak w określonych okolicznościach odstępstwa od tych postanowień. Przy transpozycji do polskiego prawa powinno się to uwzględnić.

Możliwość prowadzenia działalności przez hodowców (obecnie jednostki hodowlane), dostawców i użytkowników (jednostki doświadczalne) i nałożone na nich wymogi są określone i będą wymagały dopasowania naszego prawa. Dużą zmianą jest konieczność powołania przez wszystkie jednostki ciała doradczego ds. dobrostanu zwierząt (Art. 26 i 27), co może być trudne dla małych jednostek (o małej liczbie pracowników prowadzących doświadczenia na zwierzętach). Do zadań ciała doradczego ds. dobrostanu zwierząt należy obowiązek doradzania personelowi zajmującemu się zwierzętami w sprawach związanych z dobrostanem zwierząt, stosowania zasady 3 R (zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia), przekazywanie informacji o osiągnięciach technicznych i naukowych związanych ze stosowaniem tego wymogu, ustanawiania i dokonywania przeglądu wewnętrznych procesów postępowania dotyczących monitorowania, zgłaszania i dalszych czynności w związku z dobrostanem zwierząt w ośrodku, jak również śledzi postępy i wyniki projektów, uwzględniając ich wpływ na wykorzystywane zwierzęta oraz określając elementy, które także przyczyniają się do zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia, jak również służąc radą w tym zakresie. Wreszcie ciało to udziela porad w sprawie programów znajdowania nowego domu dla zwierząt, w tym w sprawie właściwej socjalizacji zwierząt objętych tymi programami.

Wszystkie jednostki powinny być poddane kontroli, muszą być również inspekcje bez uprzedzenia (Art. 34). Co roku przynajmniej jedna trzecia użytkowników powinna być poddana inspekcji.

Pewne różnice pojawiają się między obecnie obowiązującym systemem wydawania zezwoleń przez lokalne komisje etyczne a ustanowionym przez Dyrektywę. Nowy system wydawania zezwoleń na wykonanie projektów (Art. 40) uwzględnia skalę dotkliwości procedur doświadczalnych, kontrolę poprawności ich prowadzenia i zgodności z uzyskanym zezwoleniem, jak również wprowadza konieczność prowadzenia retrospektywnej analizy wykonanych doświadczeń. Wszystkie procedury muszą być zaklasyfikowane jako „terminalne, bez odzyskania przytomności przez zwierzę”, „łagodne”, „umiarkowane” lub „dotkliwe” indywidualnie dla każdego przypadku. Kryteria przyporządkowania określono w załączniku VIII (Klasyfikacja dotkliwości procedur).

Przy wyborze metody wykonania doświadczenia należy dążyć do minimalizowania cierpienia zwierzęcia (Art. 13). Bardzo wyraźnie podkreślono znaczenie zasady 3 R przy ocenianiu i dopuszczaniu do wykonania proponowanych doświadczeń. W Polsce już obecnie był

stosowany system oceny projektów doświadczeń na zwierzętach, więc wymogi dyrektywy nie są nowością. Tym niemniej nowa jest możliwość *wydawania pozwoleń obejmujących wiele typowych projektów, realizowanych przez tego samego użytkownika, jeżeli projekty te mają spełnić wymogi regulowane prawem lub gdy projekty te wykorzystują zwierzęta do celów produkcyjnych lub diagnostycznych za pomocą ustalonych metod* (Art. 40, ust. 4). To może zmniejszyć uciążliwości administracyjne. Natomiast na pewno konieczność przeprowadzenia oceny retrospektywnej będzie dodatkowym obciążeniem (Art. 39). Jeżeli organ wydający zezwolenie uzna, że należy dokonać takiej oceny, to wtedy na podstawie niezbędnej dokumentacji przekazanej przez użytkownika ma ocenić, czy cele projektu zostały zrealizowane, jakie szkody zostały wyrządzone zwierzętom oraz te elementy, które mogą przyczynić się do dalszego wdrażania wymogu zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia. Ocenie retrospektywnej podlegają wszystkie projekty wykorzystujące zwierzęta z rzędu naczelnych oraz projekty z procedurami sklasyfikowanymi jako „dotkliwe”. Natomiast z wymogu poddania ocenie retrospektywnej Polska może zwolnić projekty obejmujące wyłącznie procedury zaklasyfikowane jako „łagodne” lub „terminalne, bez odzyskania przytomności przez zwierzę”.

Istotne jest w dyrektywie położenie nacisku na wprowadzanie metod alternatywnych (Rozdz. V), m.in. przez powołanie unijnego laboratorium referencyjnego (Art. 48, Załącznik VII). Dyrektywa narzuca również konieczność powołania przez państwo członkowskie krajowego komitetu ds. ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Celem komitetu ma być doradzanie właściwym organom i ciałom doradczym ds. dobrostanu zwierząt w sprawach związanych z pozyskiwaniem, hodowlą, trzymaniem, opieką i wykorzystywaniem zwierząt w procedurach oraz zapewnia wzajemne udostępnianie najlepszych praktyk. Wydaje się, że komitet ten powinien być nowym ciałem organizacyjnym. Ważne jest też, że dyrektywa (Art. 60) wymaga, by państwo członkowskie ustanowiło zasady dotyczące skutecznych, proporcjonalnych i odstraszaających sankcji, jeżeli wystąpi naruszenie przepisów krajowych przyjętych zgodnie z dyrektywą.

## **The new Directive 2010/63/EU triggers the need for some essential changes in Polish law on animal experimentation**

S. KASICKI

*Nencki Institute of Experimental Biology, PASc, 3 Pasteura Street, 02 – 093 Warsaw*

The new EU Directive on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU) has been passed by the European Parliament and the Council. Poland, like other Member States shall adopt and publish, by 10<sup>th</sup> November 2012, the laws, regulations and administrative provisions necessary to comply with this Directive, and shall apply those provisions from 1<sup>st</sup> January 2013.

The new Directive sets specific rules on: (a) the replacement and reduction of the use of animals in procedures and the refinement of the breeding, accommodation, care and use of animals in procedures; (b) the origin, breeding, marking, care and accommodation and killing of animals; (c) the operations of breeders, suppliers and users; (d) the evaluation and authorization of projects involving the use of animals in procedures. Procedures may be carried out on animals for defined purposes only. Among them are listed: (a) basic research; (b) translational or applied research including the development, manufacture or testing of the quality, effectiveness and safety of drugs, foodstuffs and feedstuffs and other substances or products; (c) higher education, or training for the acquisition, maintenance or improvement of vocational skills; and (d) forensic inquiries. The current Bill on animal experimentation in Poland already covers these areas, with exception to forensic inquiries (using animals for this purpose is not allowed). The general scheme of our system for supervising animal experimentation seems to fit in general to the system established by the new Directive. However, there are some new demands which must be transposed to our new Bill on animal experimentation.

From a practical point of view several new rules or standards are especially important because they will need introducing new principles or they will result in serious expenses. The new care and accommodation standards (set out in Annex III) should be applied from 1 January 2017. This probably will be the most expensive part of the transposition of the Directive to Polish law. The list of animals who should be bred specifically for use in procedures (Annex I) have been expanded.

The new demand is that each breeder, supplier and user sets up an animal – welfare body. In the case of small breeders, suppliers and users this task can be fulfilled by other means. This body should include at least one person responsible for the welfare and care of the animals and, in the case of a user, a scientific member. The classification of experimental procedures

according to their severity already is part of Polish law, but the current classification will need to be adjusted to new categories, established by the Directive. It is likely that it will be necessary to appoint a new body responsible for carrying out regular inspections of all breeders, suppliers and users. The frequency of inspections should be adapted to each establishment, and at least one third of the users should be inspected each year (some of the inspections shall be carried out without prior warning).

The new rule, currently not part of Polish law, will be the retrospective assessment carried out by the competent authority which shall, on the basis of the necessary documentation submitted by the user, evaluate (a) whether the objectives of the project were achieved; (b) the harm inflicted on animals, including the numbers and species of animals used, and the severity of the procedures; and (c) any elements that may contribute to the further implementation of the requirement of replacement, reduction and refinement.

It is currently unclear to what extent the existing system of ethics commissions in Poland can successfully carry out the new demands and tasks outlined in the new EU Directive, specifically issuing authorization, carrying out inspections and evaluating ethical issues of the planned projects and procedures on animals. Member States may designate one or more competent authorities to be responsible for the implementation of the Directive. It is possible for Member States to designate bodies other than public authorities but only when there is proof that the body (a) has the expertise and infrastructure required to carry out the tasks; and (b) is free of any conflict of interests as regards the performance of the tasks.

It will be necessary to establish a national committee for the protection of animals used for scientific purposes. It shall advise the competent authorities and animal – welfare bodies on matters dealing with the acquisition, breeding, accommodation, care and use of animals in procedures and ensure sharing of the best practice. It is not obvious whether these tasks should be assigned to the existing National Ethics Committee on Animal Experimentation.

The examples given above show that, although the general principles are already implemented in Polish law, transposition of all the aspects outlined in the new Directive will not be easy and straightforward task.

## **Lezje rdzenia i powłoki w jądrze półleżącym wywołane podaniem 5,7-DHT wpływają przeciwnie na proces analizy nieistotnych bodźców**

H.J. CASSADAY<sup>1</sup>, K.E. THUR<sup>1</sup>, C.A. MARSDEN<sup>2</sup>, A.J.D. NELSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *School of Psychology, University of Nottingham, Nottingham, UK*

<sup>2</sup> *School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK*

Hamowanie utajone (latent inhibition, LI) – osłabione warunkowanie na bodziec, z którym zwierzę spotkało się wcześniej, gdy nie miał wtedy żadnego znaczenia – jest zjawiskiem występującym u wielu gatunków. Uważa się je za miarę zdolności do ignorowania nieistotnych bodźców. Wcześniej wykazaliśmy, że jądro półleżące (NAc) jest kluczowym elementem sieci nerwowej odpowiedzialnej za LI. Dla zbadania roli wejścia serotoniny (5-HT) do jądra półleżącego wykonaliśmy lezje obszarów rdzenia i powłoki za pomocą 5,7 – dihydroksytryptaminy (5,7-DHT). W eksperymencie 1 użyto procedury warunkowania, która wytwarza LI w sposób niezawodny u zwierząt kontrolnych. W eksperymencie 2 zmodyfikowaliśmy procedurę, zmniejszając liczbę prezentacji bodźców przed właściwym warunkowaniem, by zapobiec wywołaniu LI u zwierząt kontrolnych. Lezje 5,7-DHT przyśrodkowej powłoki jądra półleżącego były selektywne anatomicznie, gdyż wywołały istotny spadek 5-HT w powłoce (-65,5%), a minimalne zmiany w sąsiadującym rdzeniu (+13%). Lezja rdzenia spowodowała w nim spadek 5-HT (76,0%), ale dała również istotny spadek 5-HT w próbkach z powłoki (-33,4%). W Eksperymencie 1 serotoninowa deafferentacja rdzenia (+ powłoki) przerywała LI, natomiast efekt LI był wyraźnie obecny w grupach zwierząt kontrolnych i z lezją w powłoce. W Eksperymencie 2, w którym (zgodnie z oczekiwaniami) zmniejszona liczba prezentacji bodźców przed warunkowaniem skutecznie zapobiegła wystąpieniu LI, lezja powłoki nasiliła wystąpienie LI. To rozdzielenie funkcji między rdzeniem i powłoką (przerwanie i nasilenie LI) jest odwrotne do skutków, które stwierdzono po lezjach elektrolitycznych i ekscytotoksycznych. Niniejsza praca podkreśla więc znaczenie neuromodulacji w kluczowych strukturach mózgu i stanowi kolejny dowód pokazujący znaczenie systemu serotoniny w przodomózgowiu dla poznawczej elastyczności.

## **Opposing effects of 5,7-DHT lesions to the core and shell of the nucleus accumbens on the processing of irrelevant stimuli**

H.J. CASSADAY<sup>1</sup>, K.E. THUR<sup>1</sup>, C.A. MARSDEN<sup>2</sup>, A.J.D. NELSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *School of Psychology, University of Nottingham, Nottingham, UK*

<sup>2</sup> *School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK*

Latent inhibition (LI) is a cross – species phenomenon – poor conditioning to a stimulus that has previously been experienced without consequence – and is considered to measure the ability to ignore irrelevant stimuli. Previous work has identified the nucleus accumbens (NAc) as a key component of the neural circuitry underpinning LI. To examine the role of serotonergic (5-HT) input to NAc, we used 5,7 – dihydroxytryptamine (5,7-DHT) to lesion core and shell sub–regions. Experiment 1 used experimental conditions which produce reliable LI in shams. Experiment 2 used a procedural manipulation – reduced number of stimulus pre – exposures – designed to prevent the emergence of LI in shams. The 5,7-DHT lesions to the medial shell were anatomically selective in that they produced significant 5-HT depletions within the shell (–65.5%) but only minimal changes in the adjacent core (+13%). The core lesion depleted core 5-HT (–76.0%) but also resulted in significant 5-HT loss in the shell sample (–33.4%). In Experiment 1, serotonergic deafferentation of the core(+shell) disrupted LI whilst the LI effect was clearly demonstrated in the sham – and shell – lesioned groups. In Experiment 2, in which (as expected) the reduced number of pre – exposures successfully precluded LI in the shams, the shell lesion potentiated LI. This dissociation in function between the core and shell (in disrupting and potentiating LI) is the reverse of that found with electrolytic and excitotoxic lesions.

Thus the present study underscores the importance of neuromodulation within key brain structures and complements emerging evidence showing the importance of forebrain serotonergic systems to cognitive flexibility.

## Zależne od wieku zmiany biochemiczne i molekularne w mózgu młodych i starych myszy transgeniczných z APP – Tg(Thy1;APP)<sup>Val717Ile</sup>

M. CHALIMONIUK<sup>1</sup>, M. GAŚOWSKA, M. CIEŚLIK<sup>1</sup>, J. LANGFORT<sup>2</sup>,  
A. KOWALCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, <sup>2</sup>Zakład Farmakologii Doświadczalnej, <sup>3</sup>Zwierzętnia Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN.

Mutacje związane z prekursorowym białkiem amyloidu (APP) prowadzą do wzmożonej produkcji lub/i agregacji amyloidu beta (A $\beta$ ), co wskazuje na jego rolę w patogenezie rodzinnej postaci choroby Alzheimerera. U myszy transgeniczných FVB–Tg(Thy1;APP)<sup>Val717Ile</sup> występują zaburzenia w procesie proteolizy APP a także kumulowanie szkodliwego  $\beta$ –amyloidu w mózgu. Myszy te stanowią jeden ze zwierzęcych modeli rodzinnej postaci choroby Alzheimerera (AD), będącej zespołem zaburzeń neurodegeneracyjnych mózgu, prowadzących do demencji. Istnieją silne dowody, że przyczyną dysfunkcji neuronalnej i synaptycznej w AD jest neurotoksyczny efekt A $\beta$ , który tworzy wolne rodniki w procesie peroksydacji lipidów, białek oraz uszkodzeń DNA.

Celem badań była ocena zmian biochemicznych i ekspresji wybranych enzymów u 2– i 6–miesięcznych myszy transgeniczných FVB Tg(Thy1;APP)<sup>Val717Ile</sup> (APP<sup>+/+</sup>).

Do badań używano 2– i 6–miesięczne samice myszy (APP<sup>+/+</sup>) oraz myszy FVB (APP<sup>-/-</sup>) jako kontrole. Myszy transgeniczne APP<sup>+/+</sup> z mutacją Val717Ile charakteryzują się zaburzeniami w procesie proteolizy APP i kumulowaniem szkodliwego białka  $\beta$ –amyloidu w mózgu, dopiero w 6 miesiącu życia. Myszy te mają podobnie jak ludzie zaburzenia zdolności kognitywných.

U 2–miesięcznych myszy transgeniczných APP<sup>+/+</sup> obserwowano, w porównaniu do kontroli, obniżenie stężenia dopaminy oraz wzrost jej metabolitów: kwasu homowalinowego i DOPAC oraz wolnych rodników w systemie nigrostriatalnym. Efekt ten był jeszcze bardziej nasilony u 6–miesięcznych myszy transgeniczných APP<sup>+/+</sup>.

W zależności od wieku obserwowano zmianę aktywności i poziomu białka syntazy tlenu azotu oraz enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym i systemem naprawczym DNA w mózgu myszy transgeniczných APP<sup>+/+</sup>. Wyniki te wskazują na istnienie istotnej zależności między amyloidem beta a stresem oksydacyjnym i wpływem na zaburzenia funkcji neuronów u 2–miesięcznych myszy APP<sup>+/+</sup> zanim pojawiają się złogi amyloidowe w korze mózgu.



**Age-dependent biochemical and molecular changes in the brain of young and aged transgenic mice Tg (Thy,APP)<sup>Val717Ile</sup>**

M. CHALIMONIUK<sup>1</sup>, M. GAŚOWSKA, M. CIEŚLIK<sup>1</sup>, J. LANGFORT<sup>2</sup>,  
A. KOWALCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Signaling, <sup>2</sup>Department of Experimental Pharmacology, <sup>3</sup>Animal House, Mossakowski Medical Research Center Polish Academy of Sciences

Amyloid precursor protein (APP) mutations cause increased production and aggregation of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), what indicates it's role in familial form of Alzheimer's disease (AD). Transgenic mice FVB-Tg(Thy,APP)<sup>val717Ile</sup> exhibit disorders in APP proteolysis and accumulate aggregates containing harmful  $\beta$ -amyloid. These mice are used as an animal model of a familial form of AD, a complex of neurodegenerative brain disorder causing dementia. There is compelling evidence that neuronal and synaptic dysfunction in AD is caused by the neurotoxic effects of  $A\beta$ , which produces free radicals in the process of lipid and protein peroxidation and DNA damage.

The aim of this study was to estimate the biochemical changes and expression of certain enzymes in young (2 months old) and aged (6 months old) FVB-Tg(Thy,APP)<sup>val717Ile</sup> transgenic mice. Female APP<sup>+/+</sup> and APP<sup>-/-</sup> wild-type mice aged 2 and 6 months old were used in this study. At 6 months of age, APP<sup>+/+</sup> mice with a Val7127Ile mutation displayed impaired proteolysis of APP and also the accumulation of harmful  $\beta$ -amyloid protein in the brain. In addition, at 2 months of age, we observed a reduction in dopamine (DA) content and an increased concentration of the DA metabolites, homovanillic acid and DOPAC, as well as free radicals in the nigrostriatal system of APP<sup>+/+</sup> mice, compared to wild-type controls. These changes were more pronounced in 6 month old APP<sup>+/+</sup> mice. Moreover, we observed age-dependent changes in the activity and content of nitric oxide synthase and enzymes related to oxidative stress and DNA repair. The results provide important information linking  $\beta$ -amyloid with oxidative stress and their influence on disorders of neuronal function in 2 month old APP<sup>+/+</sup> mice which preceded  $\beta$ -amyloid deposition in the brain cortex..

## **Badanie aktywności biologicznej nowej grupy kannabinoidów na szczurach laboratoryjnych szczepu Wistar**

O. SZELESZCZUK<sup>1</sup>, Ł. ŻYWIECKI<sup>1</sup>, M. GORCZYŃSKI<sup>1</sup>, P. SZAFRAŃSKI<sup>2</sup>,  
T. WRÓBEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Polska*

<sup>2</sup> *Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Polska*

Celem naszych badań była estymacja aktywności biologicznej nowo zsyntetyzowanej grupy związków z rodziny kannabinoidów na szczurach laboratoryjnych szczepu Wistar.

Doświadczenie przeprowadzano na 150 samcach w wieku 2,5 miesiąca podzielonych na 30 grup po 5 samców w każdej grupie. Doświadczenie składało się z trzech etapów: procedury wstępnej, próby kontrolnej oraz szeregu procedur badawczych. Dawki podanych dootrzewnowo testowanych związków JCC-44 i JCC-45 wynosiły 7, 70 i 150 mg/kg m.c., rozpuszczone w DMSO w taki sposób, aby każda dawka została podana o objętości 350 µl dla JCC-44 oraz 450 µl dla JCC-45. Dla pomiarów referencyjnych racematu CP 55,940 dawka czystego (-) CP55, 940 wynosiła 10, 50, 100 i 700 µg związku/kg m.c., natomiast dawka dla (+) CP55 dawka była dwukrotnie wyższa. Każda dawka była zawarta w 20 µl DMSO.

W celu określenia aktywności biologicznej podawanych związków na zwierzętach przynależących do poszczególnych grup doświadczalnych przeprowadzono testy, które miały na celu określenie ich aktywności psychoruchowej, motorycznej, temperatury ciała oraz percepcji bólu.

Miejsce iniekcji, stężenie leku oraz jego aktywność biologiczna miały istotny wpływ na zachowanie, fizjologię oraz reakcję na bodźce zewnętrzne szczurów laboratoryjnych. Po podaniu testowanych związków kannabinoidowych wystąpił efekt hipotermii. Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą wysokiego działania przeciwbólowego testowanych związków kannabinoidowych, poprzez obniżenie progu bólu.

Badania przeprowadzono w ramach programu *Ventures* przy współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Complutense University w Madrycie.

## **Evaluation of biological activity of a new group of cannabinoids on laboratory Wistar rats**

O. SZELESZCZUK<sup>1</sup>, Ł. ŻYWIECKI<sup>1</sup>, M. GORCZYŃSKI<sup>1</sup>, P. SZAFRAŃSKI<sup>2</sup>,  
T. WRÓBEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Animal Reproduction and Anatomy, University of Agriculture, Krakow, Poland*

<sup>2</sup>*Faculty of Chemistry Jagiellonian University, Krakow, Poland*

The aims of our study were estimation of biological activity of newly synthesized groups of compounds of cannabinoids on laboratory Wistar rats.

The experiments were carried out on 150 male aged 2.5 months, divided into 30 groups of 5 males in each. Experience consisted of three stages: the initial procedure, control test, and the series of experimental procedures.

Dose tested compounds by JCC-44 and administered by JCC-45 is 7, 70, and 350 mg/kg body weight, therefore dissolved in DMSO in such a way that each dose was given volume 350 µl for by JCC-44 and 450 µl for by JCC-45. For measurements of CP 55,940 racemate reference dose of pure (s) CP55, 940 were 10, 50, 100 and 700 µg connection/kg body weight, while racemate (+) CP55, 940 was twice. Dose of racemate dissolved in 20 µl DMSO.

In rats given to individual groups of the experimental test were conducted hypothermal, anesthesia, orientation, and physical activity, and catalepsies.

The site for the injection, the dose accordingly and its biological activity have a significant impact on behavior, physiology, and response to stimuli of exterior of experimental rat. Newly synthesized a groups of compounds of cannabinoids had a negative effect on the orientation of the open field and motion experimental rats. After administration of cannabinoids we also observed the hypothermic effect. Therefore, on the basis of cannabinoids lowered the threshold of pain, as evidenced by the property analgetic of these compounds and their selectivity.

The study was conducted under the Venture project in cooperation with Faculty of Chemistry Jagiellonian University and Complutense University in Madrid

## **Wpływ długotrwałego podawania rutyny na pamięć przestrzenną i neuroprzeżywalność u szczurów**

J. PYRZANOWSKA, K. BLECHARZ – KLIN, A. PIECHAL, I. JONIEC – MACIEJAK, E. WIDY – TYSZKIEWICZ

*Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa, Polska*

Rutyna to powszechnie występujący w diecie glikozyd flawonoidowy złożony z kwercetyny i dwucukru rutynozy. Niektóre badania przedkliniczne wskazują, że rutyna posiada zdolność przechodzenia przez barierę krew–mózg i wpływa na wiele procesów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Przeprowadzone badania skłoniły nas do wysunięcia i zbadania hipotezy, że długotrwałe podawanie rutyny może wpływać na pamięć przestrzenną u starych szczurów. Standaryzowany, sproszkowany preparat rutyny (Rutin DAB10, Kaden Biochemicals) zawieszono w roztworze etylocelulozy w celu uzyskania konsystencji odpowiedniej do podania przez zgłębnik. 18-miesięczne samce szczurów Wistar otrzymywały rutynę w dawce 100 (R100) lub 200 (R200) mg/kg m.c./dobę, natomiast zwierzętom z grupy kontrolnej podawano roztwór etylocelulozy (Con). Wpływ 8-tygodniowego stosowania rutyny na zachowanie zwierząt badano w teście labiryntu wodnego. Analiza wariancji wykazała znamienne różnice w liczbie przepłynięć nad uprzednią lokalizacją podwodnej platformy w kwadrancie SE w 10 dniu doświadczenia (R100:  $4.33 \pm 1.52$ ; R200:  $1.5 \pm 0.42$ ; Con:  $1.7 \pm 0.3$ ) ( $F_{(2,21)}=4.03$ ;  $p=0.033$ ). Oceniano także wpływ rutyny na stężenie monoamin i ich metabolitów w wybranych strukturach mózgu. Znamienne statystycznie różnice w stężeniu noradrenaliny obserwowano w hipokampie (R100:  $510.73 \pm 80.05$ ; Con:  $233.57 \pm 43.63$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=7.28$ ,  $p=0.004$ ). W korze przedczołowej odnotowano istotne różnice międzygrupowe w poziomie metabolitu noradrenaliny – kwasu homowanilinowego (R100:  $20.18 \pm 2.73$  ng/g; R200:  $19.62 \pm 3.24$  ng/g vs. Con:  $39.80 \pm 6.86$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=4.83$ ,  $p=0.02$ ). Obserwowano także statystycznie znamienne różnice w poziomie dopaminy (R100:  $541.94 \pm 46.59$  ng/g; R200:  $334.96 \pm 51.05$  ng/g; Con:  $226.39 \pm 32.29$ ) ( $F_{(2,21)}=12.8$ ,  $p=0.0002$ ) oraz jej metabolitu – kwasu 3,4-dwuhydroksyfenylooctowego (R100:  $109.98 \pm 10.06$  ng/g; R200:  $67.79 \pm 4.69$  ng/g vs. Con:  $43.32 \pm 6.18$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=22.7$ ,  $p=0.00001$ ) w podwzgórzu.

## **Effect of long-term administration of rutin on spatial memory and neurotransmission in rats**

J. PYRZANOWSKA, K. BLECHARZ – KLIN, A. PIECHAL, I. JONIEC – MACIEJAK, E. WIDY – TYSZKIEWICZ

*Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Medical University of Warsaw, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warsaw, Poland*

Rutin is a common dietary flavonol glycoside composed of quercetine and disaccharide rutinose. Some pre-clinical research has suggested that rutin may cross the blood-brain barrier and affect various intra- and extra-cellular mechanisms in CNS.

We hypothesize that long-term rutin administration may influence spatial memory in aged rats. In the experiment the standardised rutin powder (Rutin DAB10, Kaden Biochemicals) was added to ethylcellulose solution to form the suspension that was given to the rats by the gastric gavage. 18-month old male Wistar rats received rutin at dose 100 (R100) or 200 (R200) mg/kg b.w./day. Control animals received the solution of ethylcellulose (Con). Behavioural effects were analysed in a water maze test after 8 weeks of rutin administration.

Analysis of variance demonstrated significant differences in the number of crossings over the previous localization of the platform in SE quadrant in the probe trial on day 10 (R100:  $4.33 \pm 1.52$ ; R200:  $1.5 \pm 0.42$ ; Con:  $1.7 \pm 0.3$ ) ( $F_{(2,21)}=4.03$ ;  $p=0.033$ ).

Levels of monoamines and their metabolites in selected brain regions were also estimated. Statistically significant differences in hippocampal noradrenaline content among the groups were observed (R100:  $510.73 \pm 80.05$ ; Con:  $233.57 \pm 43.63$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=7.28$ ,  $p=0.004$ ). In the prefrontal cortex significant differences were noticed in the levels of noradrenaline metabolite – homovanillic acid (R100:  $20.18 \pm 2.73$  ng/g; R200:  $19.62 \pm 3.24$  ng/g vs. Con:  $39.80 \pm 6.86$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=4.83$ ,  $p=0.02$ ). There were statistically significant differences noticed in the hypothalamus in the levels of dopamine (R100:  $541.94 \pm 46.59$  ng/g; R200:  $334.96 \pm 51.05$  ng/g; Con:  $226.39 \pm 32.29$ ) ( $F_{(2,21)}=12.88$ ,  $p=0.00022$ ) and its metabolite – 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (R100:  $109.98 \pm 10.06$  ng/g; R200:  $67.79 \pm 4.69$  ng/g vs. Con:  $43.32 \pm 6.18$  ng/g) ( $F_{(2,21)}=22.7$ ,  $p=0.00001$ ).

## **Wpływ działania krótkotrwałego stresora na zachowanie szczurów ze stada Wistar utrzymywanych w różnych warunkach społecznych**

A. REINHOLZ – TROJAN

*Zakład Psychologii Zwierząt, Wydział Psychologii Uniwersytet Warszawski*

Zwierzęta społeczne mogą ujawniać patologię zachowania w wypadku utrzymywania ich w skrajnie niekorzystnych sytuacjach społecznych takich jak izolacja czy przegęszczenie, inaczej również reagują na stres. Rodzi się pytanie czy przywracanie optymalnej wielkości grupy może spowodować złagodzenie skutków stresora i czy będzie to mieć obserwowalne konsekwencje we wskaźnikach behawioralnych? Zagadnienie redukcji skutków stresu u zwierząt jest stosunkowo mało poznane, choć może mieć zasadnicze, praktyczne znaczenie odnośnie utrzymywania, hodowli i transportu zwierząt.

Obiektem badań było 80 samców szczurów stada Wistar, które w wieku ok. 6 tygodni trafiły do zwierzętarni, gdzie przez 14 dni podlegały procedurze adaptacji w standardowych klatkach. Następnie zwierzęta zostały losowo przydzielone do jednej z 5 grup, w których panowała odmienna sytuacja społeczna. Połowa zwierząt z każdej grupy poddana została stresorowi (naświetlania przez 24 godziny lampą stroboskopową, pracującą z częstotliwością 0,5 Hz). W końcowej części eksperymentu szczury badane były w kamerach samoekspozycyjnych.

Wyniki poddano dwuczynnikowej analizie wariancji, gdzie zmiennymi niezależnymi były: „sytuacja społeczna” i „stres”. Analiza statystyczna ujawniła efekt główny zmiennej „sytuacja społeczna” w zakresie wejrzeń do otworu aktywnego kamery samoekspozycyjnej (szczury izolowane w pierwszej fazie eksperymentu, jak i te izolowane przez cały czas wykazywały mniejszą aktywność w zakresie tego wskaźnika niż szczury żyjące w przegęszczeniu

w pierwszej fazie oraz żyjące w przegęszczeniu przez cały czas trwania eksperymentu), a także alternacji (szczury izolowane tylko w pierwszej fazie eksperymentu miały istotnie niższe wyniki od pozostałych grup, zaś szczury utrzymywane w przegęszczeniu w pierwszej fazie eksperymentu miały istotnie niższe wyniki od tych, które utrzymywane były w przegęszczeniu przez cały eksperyment).

## **Effect of short-term stressor on the behavior of Wistar rats reared in different social conditions**

A. REINHOLZ – TROJAN

*Department of Animal Behaviour, Faculty of Psychology, University of Warsaw*

Social animals may reveal the pathology of behavior in the case of keeping them in an extremely unfavorable social situations, such as isolation or overstocking, they also react differently to stress. This raises the question whether restoring the optimal size of the group may attenuate the effects of stressor and whether it will have observable consequences in behavioral indicators? The issue of reducing the effects of stress in animals is relatively little known, although it can have substantial practical importance for the maintenance, breeding and transportation of animals.

The object of the study were 80 male Wistar rats, which at the age of about six weeks went to Animal House. There they were subject to the procedure of adaptation in standard cages for 14 days. Then the animals were randomly assigned to one of five groups, in which there was a different social situation. Half of the animals from each group was subjected to stressor (exposure for strobe lamp for 24 hours, working at a frequency of 0.5 Hz). In the final part of the experiment the rats were tested in Skinner box.

The results were obtained through two-way analysis of variance, where the independent variables were "social situation" and "stress." Statistical analysis revealed a main effect of the variable "social situation" in the amount of glances to the active aperture which was situated in self-exposure camera (rats isolated during the first phase of the experiment, as well as those isolated at all times showed less activity in terms of this ratio than rats living in overstocking in the first phase and living in overstocking throughout the duration of the experiment), and alternation (rat isolated only in the first phase of the experiment had significantly lower scores than other groups, the rats were kept in overstocking in the first phase of the experiment had significantly lower scores than those who were kept in the overstocking the whole experiment).

## **Wpływ warunków hodowli na poziom zabawy oraz eksploatacji u szczurów Wistar**

Ł. TANASŃ, P. OSTASZEWSKI

*Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej, Wydział Psychologii Uniwersytet Warszawski*

24 samce Wistar przydzielono w wieku 24 dni do 4 warunków eksperymentalnych: wychowanie samotne vs w parze oraz w warunkach standardowych vs wzbogaconych (zestaw obiektów umieszczonych w klatce hodowlanej). Przeprowadzono dwie obserwacje wpływu warunków hodowli na poziom zabawy społecznej i zabawy z obiektem, pierwszą w wieku 40 dni, drugą w wieku 61 dni. W tym celu zwierzęta były umieszczane w klatce zawierającej nowe obiekty, z nieznanym osobnikiem na okres 15 minut. Poziom zachowań eksploracyjnych zwierząt mierzono indywidualnie w wieku 100 dni przy użyciu trzech testów behawioralnych: kamery samo-ekspozycyjnej, uniesionego labiryntu krzyżowego oraz testu otwartego pola. Wyniki wskazują, że deprivacja społeczna i wzbogacone środowisko wpływają na zwiększenie poziomu zabawy społecznej (silniejszy wpływ deprivacji społecznej), ale nie zabawy z obiektem. Wpływ warunków hodowli na zachowania eksploracyjne był niejednoznaczny. Uzyskano istotne różnice jedynie w jednym z trzech testów behawioralnych.

## **Effects of rearing conditions on play and exploratory behavior of Wistar rats**

Ł. TANASŃ, P. OSTASZEWSKI

*Warsaw School of Social Sciences and Humanities, Psychology faculty University of Warsaw*

24 male Wistar rats were divided at age 24 days into 4 rearing conditions: solitary vs paired and standard vs enriched cages (several objects were placed in cages). Two observations of the effect of rearing conditions on social and object play were conducted, first at the age of 40 days and second at the age of 61 days. Animals were placed in a novel enriched cage with a novel conspecific and their behavior recorded during 15 min trials. Exploratory behavior was measured at the age of 100 days using a self-exposure chamber, an elevated plus maze and an open field test. Results show that social deprivation and environmental enrichment lead to an increase of social play, but not object play, with social deprivation having a stronger effect. Influence of rearing conditions on exploratory behavior was less clear, with a significant difference between the groups obtained in only one of the three tests.



## **Linie myszy selekcyjonowane przeciwstawnie na aktywność w teście otwartego pola**

E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA, M. GAJEWSKA, A. STRZAŁKOWSKA,  
K. UNRUG – BIELAWSKA

*Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych, Centrum Onkologii – Instytut, ul. W.K. Roentgena 5,  
02-781 Warszawa, [mgajewska@coi.waw.pl](mailto:mgajewska@coi.waw.pl)*

Myszy lekkie i ciężkie (L i C), wywodzące się z tego samego stada outbredowego, były selekcyjonowane od 1970 roku w kierunku obniżenia (linia L) i podniesienia (linia C) masy ciała w 21 dniu życia. W wyniku prowadzonej pracy hodowlanej zmieniła się nie tylko masa hodowanych zwierząt, ale także szereg innych cech, między innymi zachowanie. Z linii tych w 116 generacji, po przekrzyżowaniu ich między sobą (C x L), wyprowadzono linie selekcyjne różniące się zachowaniem w teście otwartego pola.

Z pokolenia F2 wybrano 2 grupy zwierząt: grupę myszy o wysokiej aktywności (oznaczone symbolem A) oraz grupę o niskiej aktywności (B) w teście otwartego pola. Zwierzęta te nie różniły się między sobą masą ciała. Przez kolejnych 10 pokoleń (5 w zwierzętarni Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW, następnych 5 w zwierzętarni Zakładu Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych CO-I) prowadzono pracę hodowlaną przyjmując jako jedyne kryterium selekcji aktywność w teście otwartego pola określaną punktowo.

Obecnie (10 pokolenie selekcyjne) średnia ocena aktywności myszy z linii A to 224 punkty (SD 79,1), podczas gdy zwierząt z linii B to 4 punkty (SD 10,1). Zaobserwowano również zmniejszenie liczby młodych urodzonych w linii nieaktywnej (średnio w miocie 6,8) w stosunku do linii aktywnej (średnio w miocie 9,8). W dalszym ciągu zwierzęta z obu linii nie różnią się masą ciała.

Wstępne analizy molekularne wykazały, że obie linie cechuje podobny poziom zmienności genetycznej ( $H_A=0,26$ ,  $H_B=0,25$ ). Obecnie trwają prace nad określeniem, czy można wskazać konkretne rejony genomu różniące badane linie.

## **Lines of mice selected oppositely for activity in open – field test**

E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA, M. GAJEWSKA, A. STRZAŁKOWSKA, K. UNRUG – BIELAWSKA

*Department of Genetics and Laboratory Animal Breeding, Maria Skłodowska – Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, W.K. Roentgena St. 5, 02–781 Warsaw, [mgajewska@coi.waw.pl](mailto:mgajewska@coi.waw.pl)*

Since 1970, light and heavy mice (L and C) derived from the same outbred stock, have been selected for two purposes: to increase weight of mice (line L) or to decrease the weight (line C) which they reached at age 21 days. Breeding resulted in changes not only as far as mice weight was concerned, but also with regards to number of others features, for example behavior. 116 generations of L and C lines were crossed (C x L) and as a result several lines of mice representing different behavioral patterns when in the open – field test were selected.

Two groups of mice that originated from the F2 generation of (C x L) were selected: the highly active group (line A) and a group that showed low activity in the open – field test (line B). The animals did not show any difference as far as weight was concerned. The breeding process continued for next 10 generations (5 in Department of Genetics and Animal Breeding, Warsaw University of Life Science, next 5 in Department of Genetics and Laboratory Animal Breeding, Maria Skłodowska – Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology). The only criterion for selection was the activity demonstrated in the open – field test, which was defined pointwise.

Today, the average activity score in mice from the tenth selected generation, is 224 points (SD 79,1) for mice from line A, while only 4 points (SD 10,1) for animals from line B. A reduce number of newborns was observed in the non–active line (average 6,8 in litter) compared to an average of 9,8 newborns in litter in active line. At the same time, the animals form both A and B lines do not show any differentiation as far as weight is concerned. Preliminary molecular analysis showed that both lines are characterized by similar levels of genetic variation (HA = 0.26, HB = 0.25). Currently, the investigations focus on identifying specific areas of the genome which differ the tested lines.

**Wpływ nowych diet (sojowej i kazeinowej) dla myszy i szczurów z przeznaczeniem do sterylizacji, na wzrost masy ciała oraz parametry morfologiczne i biochemiczne krwi szczurów Crl:Wistar (Han) utrzymywanych w warunkach SPF – badania porównawcze**

J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ<sup>1</sup>, A. LEWANDOWSKA<sup>1</sup>, B. MUSZYŃSKA – FURAS<sup>1</sup>, M.BARSZCZ<sup>2</sup>, G.PESZYŃSKA – SULARZ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Trójmiejska Akademicka Zwierzętnia Doświadczalna – Centrum Badawczo Usługowe, Gdański Uniwersytet Medyczny; <sup>2</sup>Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN Jabłonna

Do badań użyto pierwsze pokolenie szczurów Wistar (Han) sprowadzonych z Charles River w Niemczech utrzymywanych w hodowli niekrewniaczej w systemie Hanowerskim w warunkach SPF, w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętni Doświadczalnej Centrum Badawczo – Usługowym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Czterotygodniowe szczury podzielono na trzy grupy po 24 sztuki (12 samic i 12 samców), które karmiono przez okres 10–ciu tygodni następującymi paszami:

- nową testowaną hodowlaną paszą sojową do autoklawowania,
- nową testowaną hodowlaną paszą kazeinową do autoklawowania,
- referencyjną paszą hodowlaną dla szczurów z przeznaczeniem do autoklawowania firmy Ssniff.

Pasze te były sterylizowane w autoklawie przelotowym STERIVAP w temperaturze 121<sup>0</sup>C przez okres 20 minut, suszone około 20 minut, a następnie używane do karmienia zwierząt za barierą sanitarno – higieniczną. Kontrolę masy ciała zwierząt prowadzono co tydzień, natomiast ilości zjadanej paszy dwa razy w tygodniu. Po 8–mio tygodniowym okresie karmienia paszami u losowo wybranych zwierząt z każdej grupy (6 samic i 6 samców) zbadano parametry morfologiczne i biochemiczne krwi.

Pozostałe zwierzęta po uzyskaniu wieku dojrzałości hodowlanej, czyli od 3–ego miesiąca życia karmiono nowymi paszami bytowymi, również z przeznaczeniem do autoklawowania przez okres 6–ciu tygodni (ta część doświadczenia jeszcze jest w toku).

Dotychczas uzyskane wyniki karmienia zwierząt paszami hodowlanymi, wskazują na zadawalające przyrosty masy ciała w okresie intensywnego wzrostu zwierząt we wszystkich badanych grupach zwierząt. Zwierzęta karmione nową paszą sojową, wykazały od 4,1% do 5,3% wyższy przyrost masy ciała w porównaniu do zwierząt karmionych odpowiednią paszą firmy SSNIFF. Natomiast zwierzęta karmione nową paszą z dodatkiem kazeinianu sodu wykazywały nieznaczny mniejszy przyrost masy ciała od 1,7% do 3,7 % w stosunku do grupy kontrolnej. Ilość zjedzonej paszy, w wymienionych powyżej grupach zwierząt była porównywalna.

Otrzymane wyniki badań morfologicznych i biochemicznych utrzymywały się w zakresach norm wartości przyjętych przez laboratorium Charles River dla szczurów Crl:Wistar (Han).

## **Influence of new autoclaving diets for mice and rats on body weight growth and morphological and biochemical parameters of Wistar/Han rats maintained in SPF conditions**

J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ<sup>1</sup>, A. LEWANDOWSKA<sup>1</sup>, B. MUSZYŃSKA – FURAS<sup>1</sup>, M.BARSZCZ<sup>2</sup>, G.PESZYŃSKA – SULARZ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Tri-City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk, Poland*

<sup>2</sup> *The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition of the Polish Academy of Sciences*

The animals for investigation – Wistar (Han) rats were bred according to the Hanover system and maintained in SPF conditions. The animals for breeding come from Charles River Laboratory in Germany. Four weeks old animals were divided into three groups a 24 each (12 females and 12 males), which were fed for a period of 10 weeks with the following diets :

- newly tested breeding diets, with Soya for autoclaving,
- newly tested breeding diets with casein natrium for autoclaving,
- standard breeding diets for rats for autoclaving from Ssniff.

Diets were autoclaved in a 121<sup>0</sup>C temperature for 20 minutes, and dried by 20 minutes. Such prepared diets were used to feed animals. The weight of animals was checked once a week, and the quantity of the used diet was checked once a week as well.

After 8 weeks of feeding with the above diets 6 animals from every tested group were taken and morphological and biochemical parameters of blood samples were estimated.

The results indicate satisfying results in the increase of body growth during a very intensive period of in the life animals. Animals feed with newly tested breeding diets for autoclaving with addition of soya, indicated from 4,1% to 5,3% higher growth of body weight in comparison to the group of animals which were fed with standard breeding diets for rats for autoclaving from Ssniff company.

Animals fed with newly tested breeding diets for autoclaving with kazeine sodium addition, indicated from 1,7% to 3,7% lower growth of body weight in comparison to the group of animals which were fed with standard breeding diets for rats for autoclaving from Ssniff (control diet).

The quantity of food which was eaten by animals was comparable and no significant differences have been noticed. The results of analysis of the morphological and biochemical parameters in blood samples were in the range of norm established for Crl: Wistar (Han) rats by Charles River Laboratory.

## **Praktyka wprowadzania i stosowania zasady 3R w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej – Centrum Badawczo–Usługowym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

G. PESZYŃSKA – SULARZ, J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ

*Trójmiejska Akademicka Zwierzętarńia Doświadczalna – Centrum Badawczo–Usługowe Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego*

TAZD jest jednym z największych ośrodków w Polsce północnej wykonujących badania na zwierzętach. Zwierzętarńia zarówno dostarcza zwierzęta laboratoryjne do ośrodków naukowych jak również wykonuje badania.

Doniesienie to prezentuje zasady wprowadzania zasady 3R (REDUKCJA, ULEPSZENIE, ZASTĄPIENIE) na poziomie planowania doświadczeń jak również wykonywania badań.

Bardzo ważną rolę w procesie wprowadzania zasady 3R odgrywa lekarz weterynarii. Na poziomie planowania eksperymentu specjalista do spraw dobrostanu zwierząt przekazuje profesjonalne wskazówki i współpracuje z naukowcami udzielając im niezbędnego wsparcia z zakresu wiedzy dotyczącej wykonywania doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych. Dyskutuje z nimi procedury i ilość zwierząt niezbędnych do wykonania eksperymentu. Zastanawiają się wspólnie nad wybraniem odpowiedniej procedury zgodnie z zasadą – „*less pain, more gain*” .

Następnym krokiem jest przygotowanie wniosku do lokalnej komisji etycznej, a po otrzymaniu zgody przeprowadzane doświadczenie jest poddawane kontroli przez osobę nadzorującą doświadczenie przypisaną do konkretnego doświadczenia, ponadto lekarz weterynarii odpowiedzialny za dobrostan zwierząt sprawdza poprawność wykonywanych procedur, kondycję i dobrostan zwierząt oraz warunki środowiska.

Poprawność i zgodność z wnioskiem jest również sprawdzana przez wyznaczone osoby z lokalnej komisji etycznej która co roku wykonuje rutynowe kontrole przeprowadzanych w jednostkach naukowych doświadczeń. Ponadto kilka razy do roku Powiatowy Lekarz Weterynarii sprawdza warunki w jakich przebywają zwierzęta i są wykonywane doświadczenia, oraz ich zgodność z obowiązującym prawem.

### **3Rs implementation and practice in Tri–City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk, Poland**

G. PESZYŃSKA – SULARZ, J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ

*Tri–City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk, Poland*

Central Animal Laboratory of Medical University of Gdansk is the biggest laboratory of such kind in Northern Poland. The centre's main function is to carry out experiments for scientific purposes; it also acts as a breeding laboratory animal's service.

This work presents the way of 3 Rs rules implementation, on the steps of planning and carrying out the experiment.

A very important role in this process plays a veterinarian welfare officer. In the step of planning an experiment the veterinarian welfare officer gives professional support based on amiable complicity with young scientist. They discuss procedures and quantity of animals included in the experiment, in order to choose the best procedure according to the expression – less pain, more gain. The next step in this process is submitting an application regarding the planned experiment to the Local Ethical Committee. When the planned experiments are approved, they can be performed, then proper course of procedures and they compliance with agreement of Local Ethical Committee, is checked in various ways. The first step of supervising is carried out by the representatives of Local Ethical Committees. At the same time the correctness of the conduct of the experiment is controlled by an experienced Senior Investigator, allocated to the particular experiment. In the second step the veterinarian welfare officer supervise the procedures, the welfare of animals, and housing environment conditions.

The conditions of maintenance of animals, technical state of facility and environment, their compliance with requirements of European and national law, are monitored by Local Authority Veterinarian Inspector.

## **Kompleks laboratoriów badań *in vivo***

B. GROBELSKI

*Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi*

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dysponuje nowo otwartym kompleksem laboratoriów zajmujących się badaniami modeli *in vivo*.

Centrum kompleksu jest przebudowana i kompletnie wyposażona zwierzętarnia spełniająca najnowsze dyrektywy unijne. Wyposażenie obejmuje kwatery dla zwierząt: myszy, świnki morskie, szczury oraz króliki. Dostępne są również urządzenia do badań behawioralnych: wideomonitorowane labirynty, baseny Morrisa, skrzynie wahadłowe, aparaty do warunkowania strachu oraz system *intellilage* a także sprzęt potrzebny do badań metabolicznych: klatki metaboliczne i klatki izolowane od warunków środowiskowych.

Zwierzętarnia jest źródłem próbek analizowanych przez nasze laboratoria: hematologiczne, toksyologiczne i biochemiczne prowadzących analizy biochemiczne oraz histopatologiczne izolowanych tkanek. Dysponujemy również w pełni wyposażonym laboratorium komórkowym do badań *in vitro*.

Kompleks laboratoriów wyposażony w najnowocześniejszy sprzęt i wykwalifikowany personel jest w trakcie aplikowania o certyfikat Dobrej Praktyki Laboratoryjnej oraz przygotowuje się do zdobycia zgody Generalnego Inspektoratu Farmaceutycznego na wytwarzanie leków, który ma obejmować badania nad farmaceutykami.

Z wielką przyjemnością zapraszamy do współpracy.

## ***In vivo* laboratory complex**

B. GROBELSKI

*Animal Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz*

Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz has a newly opened complex of research laboratories for *in vivo* models.

The central point of the complex is remodeled and fully equipped Animal House meets the latest EU directives. Facilities include accommodation for the animals: mice, guinea pigs, rats and rabbits. There are equipment for behavioral research: video-monitored mazes, Morris pools, swings chests, fear conditioning apparatus and Inntellicage system and also tools needed for metabolic studies: metabolic cages and cages isolated from environmental conditions.

Animal House is the source of the samples analyzed by our laboratories: haematological biochemical and toxicological conducting biochemical and histopathological analysis of the isolated tissue. We also have a fully equipped cell laboratory for *in vitro* studies.

The complex of laboratories equipped with modern equipment and qualified personnel are in the process of applying for a certificate of Good Laboratory Practice, and is preparing to acquire the consent of the General Pharmaceutical Inspectorate of the manufacturing of drugs, which is to include research on pharmaceuticals.

With great pleasure we invite You to cooperate.



## Zwierzęta modyfikowane genetycznie hodowane w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

A. POPIELSKA<sup>1</sup>, K. STRYNKOWSKA<sup>1</sup>, E. SACHARZEWSKA<sup>1</sup>, J. NIKLIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Białymstoku/ Centrum Medycyny Doświadczalnej

Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku to nowoczesna jednostka naukowa, świadcząca usługi w zakresie badań biomedycznych zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi zapewniającymi spełnienie wymagań GLP. W Centrum prowadzona jest również hodowla wielu ciekawych modeli gryzoni laboratoryjnych. Wykonywane są również badania na nowych modelach myszy transgenicznych.

B6.129S2–Alox15<sup>tm1Fun</sup>/J Myszy homozygotyczne, zmutowane (dysfunkcja 12/15–lipooksygenazy). Wykorzystywane do badań mieloproliferacyjnych (MPD) – podobne do przewlekłej białaczki szpikowej u człowieka (CML).

Wykorzystywane do badania wpływu zahamowania funkcji lipooksygenazy na przebieg procesu zapalnego oraz przebudowy dróg oddechowych na białka roztocza kurzu domowego, a także chorób układu oddechowego w tym astmy.

Szczep myszy ze spontaniczną mutacją CByJ.Cg–Foxn1<sup>nu</sup>/J Szczep wykazuje defekt cebulek włosowych (homozygotyczne samce) oraz defekt nabłonka grasicy (bezgrasiczność), jest wykorzystywany w badaniach dermatologicznych, endokrynologicznych, immunologicznych, nowotworzenia (przerzuty), w badaniach nad biologią przeszczepów.

Szczep myszy ze spontaniczną mutacją NU/J Szczep wykazuje defekt cebulek włosowych (homozygotyczne samce) oraz defekt nabłonka grasicy (bezgrasiczność), jest wykorzystywany w badaniach dermatologicznych, endokrynologicznych, immunologicznych, nowotworzenia (przerzuty), w badaniach nad biologią przeszczepów.

### BIBLIOGRAFIA

www.umwb.edu.pl

TOURNOY KG, KIPS JC, SCHOU C, PAUWELS RA. *Airway eosinophilia is not required for allergen induced airway hyperresponsiveness*. Clin Exp Allergy 2000; 30: 79–85.

WINBLAD B., PORITIS N. *Memantine in severe dementia: results of the 9M–Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine)*. Int J Geriatr Psychiatry 1999, 14: 135–146.

## **Genetically modified animals bred at the Center for Experimental Medicine, Medical University of Bialystok**

A. POPIELSKA<sup>1</sup>, K. STRYNKOWSKA<sup>1</sup>, E. SACHARZEWSKA<sup>1</sup>, J. NIKLIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Medical University of Bialystok / Center for Experimental Medicine*

Center for Experimental Medicine, Medical University of Bialystok is the modern scientific enterprise, providing services in the range of biomedical research in accordance with international guidelines ensuring compliance with GLP requirements. In the Center are bred many interesting models of laboratory rodents and there are also conducting research on new models of transgenic mice.

B6.129S2-Alox15<sup>tm1Fun</sup>/J Homozygous mice, mutant (12/15-lipoxygenase dysfunction), which are used for myeloproliferative (MPD) research – illness similar to chronic myelogenous leukemia in humans. They are used to study the impact of inhibition of lipoxygenase function on the process of inflammation and remodeling protein respiratory house dust mites, and respiratory diseases including asthma.

Mouse strain with a spontaneous mutation CByJ.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/J Strain shows a defect in hair follicles (homozygous males) and thymus epithelial defect (athymic mice), is used in dermatological, endocrine, immunological, oncological (metastasis) research as well as in studies of transplantation biology.

Mouse strain with a spontaneous mutation NU/J Strain shows a defect in hair follicles (homozygous males) and thymus epithelial defect (athymic mice), is used in dermatological, endocrine, immunological, oncological (metastasis) research as well as in studies of transplantation biology.

### REFERENCES

www.umwb.edu.pl

TOURNOY KG, KIPS JC, SCHOU C, PAUWELS RA. *Airway eosinophilia is not required for allergen induced airway hyperresponsiveness*. Clin Exp Allergy 2000; 30: 79–85.

WINBLAD B., PORITIS N. *Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine)*. Int J Geriatr Psychiatry 1999, 14: 135–146.

**Profil prowadzonych badań z użyciem zwierząt w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej – Centrum Badawczo–Usługowym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

A. ŻYŁKO, G. PESZYŃSKA – SULARZ, J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ

*Trójmiejska Akademicka Zwierzętarńia Doświadczalna – Centrum Badawczo–Usługowe, Gdański Uniwersytet Medyczny*

Trójmiejska Akademicka Zwierzętarńia Doświadczalna – Centrum Badawczo – Usługowe (TAZD – CBU) należy do nielicznych jednostek w Polsce wykonujących badania na zwierzętach na wysokim, światowym poziomie. Będąc jedyną tego typu placówką w regionie pomorskim, zwierzętarńia świadczy usługi na rzecz prac rozwojowych i wdrożeniowych dla Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, oraz innych szkół wyższych, a także przemysłu biotechnologicznego i farmaceutycznego. Dzięki nowoczesnemu zapleczu laboratoryjnemu i wykwalifikowanemu personelowi w TAZD – CBU prowadzone są liczne wysokospecjalistyczne badania i realizowane wnioski naukowe dotyczące między innymi: oznaczania aktywności potencjalnych leków przeciwnowotworowych na ksenoprzeszczepach nowotworów ludzkich u myszy nagich i aktywności przeciwnowotworowej u zwierząt immunokompetentnych wobec przeszczepialnych nowotworów mysich i szczurzych. Wykonywane są oznaczenia toksyczności ostrej LD50 oraz dawki maksymalnie tolerowanej, a także badania farmakokinetyczne z uwzględnieniem biodostępności i różnych dróg podania preparatów. Jednostka specjalizuje się również w badaniach aktywności potencjalnych leków przeciwcukrzycowych na mysim modelu genetycznie uwarunkowanej cukrzycy (db/db) oraz przy zastosowaniu testu tolerancji glukozy. Ponadto realizowane są badania żywieniowe, a także ocena biologiczna aktywności antyoksydantów.

Jednocześnie TAZD – CBU zaopatruje regionalne jednostki naukowe w zwierzęta SPF (ang. specific pathogen free), najczęściej wykorzystywane w eksperymentach biomedycznych. Prowadzi hodowlę zwierząt laboratoryjnych myszy i szczurów, umożliwia ich hotelowanie w trakcie trwania eksperymentu oraz wykonuje procedury doświadczalne, badania morfologiczne i biochemiczne krwi zwierząt.

## **Profile of an animal research in Tri – City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of Medical University of Gdansk**

A. ŻYŁKO, G. PESZYŃSKA – SULARZ, J. PARADZIEJ – ŁUKOWICZ

*Tri–City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk,  
Poland*

The Tri – City Central Animal Laboratory – Research and Service Centre of Medical University of Gdansk is one of the few centers performing high standard research on animals in Poland. Being the only institution of such kind in the northern region the center conducts experiments for scientific purposes for The Medical University of Gdansk and also cooperates with a number of Polish scientific groups and pharmaceutical and biotechnological companies. The unit has a modern infrastructure design, staff with great experience and is technically prepared to carry out projects based on experiments on animals especially research on drug development in the first step of evaluation of new potential medicine, evaluation of toxicity and antitumor activity new antitumor compounds. The Laboratory animals service offers studies such as investigation of anticancer activity of potential anticancer drugs (in murine tumors and in human tumors xenograft models *in vivo*), investigation of antidiabetes of type 2 activity of potential drugs in murine models and tests, investigation of immunological features of drugs from plants or of chemical origin, toxicity, pharmacokinetic studies, performance of experimental procedures

TAZD – CBU also acts as a breeding laboratory animals' service. The center supplies regional units with SPF animals for biomedical experiments. The Laboratory offers also maintaining animals during the experiment, executes experimental procedures and hematological and biochemical analysis of an animal blood samples.

## **Nowe mutacje spontaniczne stwierdzone u myszy hodowanych w zwierzętarni Zakładu Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych CO-I w Warszawie**

M. GAJEWSKA, K. UNRUG – BIELAWSKA, A. STRZAŁKOWSKA, E. KRYSIAK,  
K. KERMEN – GERMANIUK, K. GILECKA, E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA

Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych, Centrum Onkologii – Instytut, ul. W.K. Roentgena 5,  
02-781 Warszawa, [mgajewska@coi.waw.pl](mailto:mgajewska@coi.waw.pl)

Zdecydowana większość (ok. 97%) polimorfizmów stwierdzanych w genomach zwierząt laboratoryjnych to tak zwane mutacje ancestralne, czyli różnice genetyczne, które istniały w genomach osobników – założycieli poszczególnych szczepów wsobnych. Pomimo zakrojonego na szeroką skalę procesu konstruowania zwierząt genetycznie modyfikowanych i programów indukowanej mutagenezy, około 70% genów zidentyfikowanych w genomie myszy nie ma jeszcze utrwalonej linii z mutacją w ich *loci*. Dlatego każda nowa zmiana genetyczna stanowi istotne źródło wiedzy o genomie i jego interakcjach ze środowiskiem.

W ostatnich latach u zwierząt hodowanych w Zakładzie zidentyfikowano cztery nowe recesywne mutacje spontaniczne:

1. mutacja barwna *wad* (MGI:4818892 ) powodująca rozjaśnienie barwy skóry i włosów, wystąpiła u myszy C3H.BN/W. Poza zmianą pigmentacji nie stwierdzono jej wpływu na funkcjonowanie organizmu zwierząt; zmapowana w dystalnej części chromosomu 10, w pobliżu markera *D10Mit271*;
2. mutacja barwna o roboczym symbolu *wab*, powodująca niewielkie rozjaśnienie barwy skóry i włosów, a także zmiany kształtu trzewioczaszki, stwierdzona u myszy szczepu CBA/W; zmapowana w proksymalnej części chromosomu 13;
3. mutacja o roboczym symbolu *ker*, powodująca zahamowanie wzrostu i rozwoju, niedorozwój grasicy, hyperfagię przy jednoczesnym braku odkładania tkanki tłuszczowej oraz zmiany skórne, stwierdzona u myszy linii CF, obecnie trwają prace nad jej zmapowaniem
4. mutacja „zakręconego ogona” stwierdzana u myszy z linii L i CF.

Wszystkie zmiany genetyczne stwierdzane u hodowanych zwierząt są poddawane szczegółowej ocenie oraz badaniom zmierzającym do precyzyjnego określenia ich molekularnego podłoża.

**New spontaneous mutations stated in mice breed in animal facility in Department of Genetics and Laboratory Animals Breeding, Maria Skłodowska – Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology in Warsaw**

M. GAJEWSKA, K. UNRUG – BIELAWSKA, A. STRZAŁKOWSKA, E. KRYSIAK,  
K. KERMEN – GERMANIUK, K. GILECKA, E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA

*Department of Genetics and Laboratory Animal Breeding, Maria Skłodowska – Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, W.K. Roentgena St. 5, 02–781 Warsaw, [mgajewska@coi.waw.pl](mailto:mgajewska@coi.waw.pl)*

The vast majority (97%) of polymorphisms found in the genomes of laboratory animals are so-called ancestral mutations – genetic differences existed in the genomes of individuals – the progenitors of different inbred strains. Despite rapid advances in construction of genetically modified mice and induction of mutagenesis, the mutations at *loci* of approximately 70% genes identified in mouse, are not fixed in mouse lines.

Therefore, each new genetic alteration is an important source of knowledge about the genome and its interaction with the environment.

Recently, four new recessive spontaneous mutations were identified in mice maintained in our Department:

1. color mutation *wad* (MGI:4818892) resulting in the lighter tone of skin and hair of mutated mice compared with C3H.BN/W mice from which carrying mutation are originated. The mutation was mapped in distal part of chromosome 10 in the vicinity of marker *D10Mit271*. The impact of the mutation on physiological function of animals was not observed.
2. color mutation, designated preliminary symbol *wab*, causing slight brightening of the skin and hair color, deformation of the viscerocranium, the mutation was found in the mouse strain CBA/W and mapped in proximal part of chromosome 13;
3. mutation with preliminary symbol *ker*, causing: inhibition of growth and development, thymi hypoplasia, hyperphagia without simultaneous accumulation of fatty tissue and skin lesions, the mutation was found in mice from CF line, the mapping of the genomic position of the mutation is in progress
4. mutation "twisted tail" observed in mice from line L and CF.

The genetic changes, observed in animals maintained in our Department, are detailed examined and the investigations focus on accurately determination of their molecular basis.

## **Wpływ sezonu na rozród nornicy rudej**

E. POCHROŃ, J. KAPUSTA, M. KRUCZEK

*Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku, ul. Gronostajowa 7, 30–387 Kraków*

Nornica ruda (*Myodes glareolus*) jest szeroko rozprzestrzenionym gryzoniem strefy palearktycznej. Gatunek ten jest coraz częściej wykorzystywany jako model badawczy w różnych dziedzinach nauki. Badania prowadzone są zarówno na osobnikach dziko żyjących, jak i hodowanych w laboratorium. W Instytucie Nauk o Środowisku UJ znajduje się hodowla nornicy rudej zapoczątkowana 30 lat temu i prowadzona systemem outbred, utrzymującym heterozygotyczność. Zwierzęta hodowane są w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, odpowiadających okresowi pełnego rozrodu nornic rudych żyjących w naturze. W trakcie prowadzonych badań nad biologią rozrodu zauważono różnice w aktywności rozrodczej w zależności od pory roku.

Celem badań było określenie wpływu sezonu na rozród nornicy rudej w warunkach hodowlanych. Zwierzęta kojarzono dwa razy do roku; styczeń (zima) oraz sierpień (lato) przez 5 lat, każdorazowo 20 par. Sprawdzano liczbę par, które urodziły potomstwo, liczbę urodzonych i odchowanych młodych oraz ciężar ciała w pierwszym i osiemnastym dniu życia.

Uzyskane wyniki wskazują, iż nornice rude hodowane w warunkach laboratoryjnych zachowały pewną sezonowość rozrodu, która odzwierciedla się głównie w jakości wydawanego potomstwa. W obu sezonach samice rodzą podobną liczbę młodych, ale pierwszą dobę przeżywa istotnie mniej osobników urodzonych w sezonie zimowym a ich ciężar w pierwszym dniu życia jest istotnie mniejszy. Różnice pojawiają się także u osobników oddzielanych od matki. Znacznie mniejsza liczba młodych urodzonych w sezonie zimowym dożywa do 18 dnia. Ponadto 18–dniowe nornice rude urodzone w sezonie rozrodczym są istotnie cięższe niż osobniki urodzone zimą. Pomimo tak długiego okresu hodowania w warunkach laboratoryjnych, przy braku wpływu czynników środowiskowych, nornica ruda zachowała sezonowość w rozrodzie.

## **Influence of season on reproduction of bank vole**

E. POCHROŃ, J. KAPUSTA, M. KRUCZEK

*Jagiellonian University, Institute of Environmental Sciences, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków*

The bank voles (*Myodes glareolus*) is mostly widespread species of rodent in Palearctic region. This species is used as a model for research in various scientific fields. Researches are conducted on wild animals or reared in the laboratory. There is a breeding colony of bank voles in the Institute of Environmental Sciences started 30 years ago. Bank voles are kept under controlled laboratory conditions, corresponding to the period of breeding season of bank voles living in the wild, but the seasonal differences in reproductive activity has been observed. The purpose of these studies was to analyse the influence of season on reproduction of bank voles under laboratory conditions. Animals were paired two times per year: in January (winter) or in August (summer), during 5 years, always 20 pairs. The number of pairs with pups, number of born and weaned animals as well as weight of 1- and 18-days old pups were checked. Obtained results showed that females delivered similar number of pups, but significantly less pups survived 1 day of life in winter and their body weights were significantly lower than in summer. Differences in the body weight were also noted at the winning time, 18 days old pups born in summer were significantly heavier than those born in winter.

In summary, in spite of stable laboratory conditions a significant influence of the season on the bank voles reproduction has been proved.



## **Wpływ selekcji prowadzonej w kierunku zwiększenia masy jąder samców myszy laboratoryjnej oraz ich wieku na długość okresu między kojarzeniem z samicą a urodzeniem młodych**

I. KOWALCZYK<sup>1</sup>, K. KACZOROWSKA<sup>1</sup>, E. MARTYNIUK<sup>1</sup>, K. GÓRAL<sup>1</sup>,  
M. PAWEŁKOWICZ<sup>2</sup>, K. FISZDON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

W pracy porównano wpływ selekcji prowadzonej na maksymalną masę jąder oraz wiek samca w momencie kojarzenia, na długość okresu od momentu kojarzenia samca z samicami do momentu urodzenia młodych. Wraz z linią selekcyjną prowadzono jednocześnie linię kontrolną. W jednym roku kalendarzowym przeprowadzono zazwyczaj trzy kojarzenia. W obu liniach jeden samiec kojarzony był z trzema samicami z unikaniem pokrewieństwa. Po około siedemnastu dniach przebywania z samcem każda z samic była przekładana do osobnej klatki. W obu liniach w jednym pokoleniu kojarzono piętnaście samców i czterdzieści pięć samic. W linii selekcyjnej plan kojarzeń opracowywano na podstawie mas obu jąder ważonych post – mortem piętnastu ojców, zaś młode samce wybierano po pięciu/sześciu osobnikach, które odznaczały się największą masą obu jąder oraz młode samice po wszystkich samcach w danym pokoleniu. W linii kontrolnej prowadzono kojarzenia rotacyjne z unikaniem pokrewieństwa, masa jąder w linii kontrolnej również była notowana post – mortem. W doświadczeniu przeanalizowano dane pochodzące z czternastu końcowych pokoleń prowadzonej selekcji (między sześćdziesiątym dziewiątym a dziewięćdziesiątym pokoleniem). Zbadano dane pochodzące od 245 samców i 467 samic linii selekcyjnej oraz 256 samców i 578 samic z linii kontrolnej.

Wyniki przeanalizowano za pomocą programu komputerowego SPSS wersja 17. Z przeprowadzonych analiz wynika, że długość okresu od skojarzenia do urodzenia młodych zależy od prowadzonej selekcji, a nie wieku ojca.

**The effects of selection towards on mass testis of male laboratory mice and their age on the length of the period between the mating with a female and the birth of the young**

I. KOWALCZYK<sup>1</sup>, K. KACZOROWSKA<sup>1</sup>, E. MARTYNIUK<sup>1</sup>, K. GÓRAL<sup>1</sup>,  
M. PAWEŁKOWICZ<sup>2</sup>, K. FISZDON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Genetics and Animal Breeding Warsaw University of Life Sciences,* <sup>2</sup>*Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences*

In order to elucidate the influence of breeding selection of the maximum mass of the testis and the age of the males on the period length since mating male with females until the birth of the young (the end of pregnancy). Together with a selection line of males, the control line was provided. The control line was mated in the rotation manner with avoidance of relatedness (free generation). In one calendar year have usually three mating. In both lines, one male was once mated with three females with avoidance of relatedness. After approximately 17 days spent with each of the females, males were transferred to a separate frame. In both lines in one generation fifteen male and forty five females were mated. In the selected line the mating plan was elaborated on the basis of the mass of both testis weighted post-mortem coming from fifteen fathers, and young males of highest testis weight were chosen after five/six fathers as young females after all male in a given generation. In the control line were associating with avoidance of relatedness, the weight of the testicles in the line of control was also recorded post-mortem. In the experiment examines data from fourteen final generations of selection (between 69th and 90th generation). We examined data from 245 male and 467 female of selected line. 256 male and 578 female of control line. The results were analyzed by software SPSS version 17. The obtained results indicate the impact that the age of male from mating to the birth of the young is not statistically significant and conducted selection does substantially affect its length.

## **Próba opracowania norm w zakresie wskaźników biało- i czerwonekrwinkowych u krajowych królików mieszańców<sup>1</sup>**

J. DZIAŁO, B. TOKARZ – DEPTUŁA, B. HUKOWSKA – SZEMATOWICZ,  
P. NIEDŹWIEDZKA – RYSTWEJ, W. DEPTUŁA

*Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński  
ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin, tel. (91) 444-16-05, e-mail: [kurp13@univ.szczecin.pl](mailto:kurp13@univ.szczecin.pl)*

Królik (*Oryctolagus cuniculus*) jest zwierzęciem o wysokiej wartości hodowlanej, ale także fundamentalnym modelowym zwierzęciem wykorzystywanym w badaniach naukowych i laboratoryjnych. Niezależnie od faktu, iż badania tego typu, bardzo często prowadzone są na myszach, szczurach i ewentualnie świnkach morskich, to jednak króliki stanowią dogodny model zwierzęcy do badań np.: nad zakażeniami wirusowymi (w tym HIV), zgodnością tkankową. Podczas eksperymentów z użyciem tych zwierząt oznaczenia wskaźników hematologicznych są podstawowymi, wykonywanymi rutynowo badaniami. Jednocześnie wskazuje się, że wartości wskaźników biało- i czerwonekrwinkowych u królików są zmienne i mogą zależeć m.in. od wieku, rasy, płci, stanów fizjologicznych czy technologii chowu i żywienia, a także warunków środowiskowych.

Stąd celem niniejszych badań jest porównanie wskaźników hematologicznych u zdrowych mieszańców królików hodowanych w Polsce w zależności od płci zwierząt, co stanowi fragment badań pilotażowych, prowadzących do ustalenia wartości referencyjnych, a w dalszej konsekwencji norm dla tych zwierząt.

Badania przeprowadzono na 40 królikach, mieszańcach krajowych tradycyjnych, bez dolewki krwi rasy mięsnej (20 samców oraz 20 samic) w wieku 3–6 miesięcy, o wadze 2,5–3,5 kg. Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniu pochodziły z licencjonowanej hodowli, będącej pod stałym nadzorem weterynaryjno-zootechnicznym. Króliki te przebywały w wivarium Katedry Mikrobiologii i Immunologii i zapewnione miały właściwe warunki zoohigieniczne i żywieniowe. Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta poddano 14-dniowej adaptacji. Krew do badań pobrano na antykoagulant (EDTA) z żyły brzeżnej ucha i oznaczono w niej za pomocą analizatora hematologicznego (Beckman Coulter AcT Diff Hematology Analyzer) hematokryt (Hct), stężenie hemoglobiny (Hb), liczbę erytrocytów (RBC) i leukocytów (WBC). Ponadto z krwi wykonano rozmaz, z którego wyliczono wzór odsetkowy leukocytów (limfocyty, neutrofile, eozynofile, bazofile oraz monocyty).

---

<sup>1</sup> Praca finansowana z grantu MNiSW nr N308 5680 39

Uzyskane wyniki sugerują, że polskie króliki mieszańce w wieku 3–6 miesięcy, o wadze 2,5–3,5 kg przetrzymywane w jednakowych warunkach nie różnią się istotnie wartościami badanych parametrów hematologicznych, choć w stosunku do królików rasowych oraz mieszańców hodowanych obecnie w Polsce z dolewem krwi królików ras mięsnych, różnice w tych wskaźnikach są spore.

## **An attempt to develop standards for indicators of red and white blood cells in hybrid domestic rabbits<sup>2</sup>**

J. DZIAŁO, B. TOKARZ – DEPTUŁA, B. HUKOWSKA – SZEMATOWICZ,  
P. NIEDŹWIEDZKA – RYSTWEJ, W. DEPTUŁA

*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Natural Sciences, University of Szczecin  
Felczaka St. 3c, 71-412 Szczecin, tel. (91) 444-16-05, e-mail: [kurp13@univ.szczecin.pl](mailto:kurp13@univ.szczecin.pl)*

Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is an animal with a high breeding value, but also the fundamental model used in animal and laboratory research. Apart from the fact that studies of this type are often carried out on mice, rats and possibly guinea pigs, rabbits, however, represent a convenient animal model for research, for example on viral infections, including HIV or tissue compatibility. During experiments with these animals examination of haematological indices is basic, routinely performed test. Moreover, it is pointed out that indicators of red and white blood cells in rabbits are variable and may depend on age, breed, sex, physiological conditions or breeding technology and nutrition, and also on environmental conditions.

Hence, the purpose of this study is to compare the haematologic indices of healthy hybrid rabbits from Poland, depending on the sex of the animals, which is part of the pilot studies leading to establishment of reference values and possibly standards for these animals.

The study was conducted on 40 traditional hybrid rabbits from Poland without addition of blood meat bread (20 males and 20 females) aged 3–6 months, weighing 2.5 – 3.5 kg. Animals used in the experiment came from a licensed farm, which is under constant veterinary and zootechnical surveillance. These rabbits were housed in the vivarium of Department of Microbiology and Immunology and were provided with proper zoohygienic and nutritional conditions. Before starting the experiment the animals were put into 14 – day adaptation. Blood samples were collected in anticoagulant (EDTA) from the marginal ear vein and marked with a hematology analyzer (Beckman Coulter AcT Diff Hematology Analyzer), hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), erythrocyte count (RBC) and leukocyte (WBC). Moreover, the blood smear was performed, from which proportion of leukocytes (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, and monocytes) was calculated.

Results suggest that hybrids of Polish rabbits aged 3–6 months, weighing 2.5–3.5 kg kept in identical conditions do not significantly differ in of haematological values of examined parameters, although in relation to pure – bred rabbits and hybrids bred out in Poland with addition of blood meat breeds rabbits the differences in these indicators are considerable.

---

<sup>2</sup> This work was funded from Ministry of Science and Higher Education grant no. N308 5680 39

## **Unikalny – wysoce podatny na rozwój chłoniaków T – szczep wsobny myszy WOM/W Oryginalny wkład w tworzenie mysich modeli chłoniaków**

H. SZYMAŃSKA<sup>1</sup>, J. LECHOWSKA – PISKOROWSKA<sup>1</sup>, E. KRYSIAK<sup>1</sup>,  
H.M. SKURZAK<sup>2</sup>, M. BOROWA – CHMIELAK<sup>1</sup>, B. PIENKOWSKA – GRELA<sup>3</sup>,  
E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA<sup>1</sup>

*Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie*

<sup>1</sup> *Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych*

<sup>2</sup> *Zakład Immunologii*

<sup>3</sup> *Samodzielna Pracownia Cytogenetyki*

Szczep wsobny myszy WOM/W został wyhodowany i jest utrzymywany w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej – Curie. Charakterystyka szczepu została zamieszczona w Jackson Mouse Strain Database.

Nekropsję wykonano na 124 myszach ze szczepu WOM/W. Ocenie patomorfologicznej poddano: grasnicę, węzły chłonne, śledzionę, wątrobę, płuca, nerki i serce. Dodatkowo oceniano aspiraty ze szpiku kostnego i krew obwodową. Metodą cytometrii przepływowej określono immunofenotyp powstałych nowotworów układu krwiotwórczego. Badanie przeprowadzono przy użyciu 11 przeciwciał monoklonalnych: CD90.2, CD3ε, CD4, CD8, TCRβ, CD5, CD45R–(B220), GAM, IgD, IgM, RAM KAPPA. 95,5% myszy poddanych nekropsji rozwinęło chłoniaki limfoblastyczne T (*Pre-T LBL*) w wieku 275 dni (mediana 260). Mikroskopowo stwierdzono cechy chłoniaka limfoblastycznego w grasicy, węzłach chłonnych, śledzionie, szpiku kostnym, krwi obwodowej i zajętych procesem organach. Immunofenotyp określony w grasicy i/lub węzle chłonnym krezki wskazywał na chłoniaka z komórek T. Grasica: CD90.2<sup>+</sup>; sCD3ε<sup>+</sup>; cCD3ε<sup>+</sup>; CD5<sup>+</sup>; TCRβ<sup>+</sup>; (CD4/CD8)<sup>+</sup> lub (CD4/CD8)<sup>-</sup> lub CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; CD45R–(B220)<sup>-</sup>; immunofenotypu CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> nie wykryto. Węzeł chłonny krezki: CD90.2<sup>+</sup>; sCD3ε<sup>+</sup>; cCD3ε<sup>+</sup>; CD5<sup>+</sup>; TCRβ<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lub (CD4/CD8)<sup>+</sup>; CD45R–(B220)<sup>-</sup>; GAM<sup>-</sup>; RAM KAPPA<sup>-</sup>; IgD<sup>-</sup>; IgM<sup>-</sup>; immunofenotypów CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> i (CD4/CD8)<sup>-</sup> nie wykryto. Szpik kostny: CD90.2<sup>+</sup>; (CD4/CD8)<sup>+</sup> lub (CD4/CD8)<sup>-</sup> lub CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Immunofenotypy komórek nowotworowych grasicy, węzła chłonnego krezki i szpiku kostnego były zbieżne. W badaniach cytogenetycznych stwierdzono ilościowe i jakościowe aberracje chromosomowe.

Stwierdzone u myszy WOM/W chłoniaki limfoblastyczne T są odpowiednikiem chłoniaków limfoblastycznych T u dzieci. Wysoka wrażliwość myszy WOM/W predysponuje je do traktowania jako model do badań nad chłoniakami T u ludzi.

## **Unique WOM/W strain highly susceptible to spontaneous T–cell lymphoma. Contribution to a novel mouse model**

H. SZYMAŃSKA<sup>1</sup>, J. LECHOWSKA – PISKOROWSKA<sup>1</sup>, E. KRYSIAK<sup>1</sup>,  
H.M. SKURZAK<sup>2</sup>, M. BOROWA – CHMIELAK<sup>1</sup>, B. PIENKOWSKA – GRELA<sup>3</sup>,  
E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA<sup>1</sup>

*The Maria Skłodowska – Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw*

<sup>1</sup> *Department of Genetics and Laboratory Animal Breeding*

<sup>2</sup> *Department of Immunology*

<sup>3</sup> *Cytogenetic Laboratory*

WOM/W strain was established and is maintained at the Center of Oncology (Warsaw). Necropsy was performed on 126 WOM/W mice. Pathomorphology of thymus, lymph nodes, spleen, liver, lung, kidney and heart was determined. The number of neoplastic haematopoietic cells was estimated in blood and bone marrow smears.

Immunophenotyping was performed by flow cytometry with 11 monoclonal antibodies: CD90.2, CD3 $\epsilon$ , CD4, CD8, TCR $\beta$ , CD5, CD45R–(B220), GAM, IgD, IgM, RAM KAPPA. 95.5 % of examined mice spontaneously developed Precursor T–cell lymphoblastic lymphoma (Pre–T LBL) at the age 275 days (median 260).

Thymus, lymph nodes, spleen, bone marrow and affected organs showed cytological and histological features of lymphoblastic lymphoma. Lymphoid neoplasms showed T–cell immunophenotypes.

Thymus: CD90.2<sup>+</sup>; sCD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>; cCD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>; CD5<sup>+</sup>; TCR $\beta$ <sup>+</sup>; (CD4/CD8)<sup>+</sup> or (CD4/CD8)<sup>–</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>–</sup> or CD45R–(B220)<sup>–</sup>; immunophenotype CD4<sup>–</sup>CD8<sup>+</sup> was not detected.

Mesenteric lymph nodes: CD90.2<sup>+</sup>; sCD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>; cCD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>; CD5<sup>+</sup>; TCR $\beta$ <sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>–</sup> or (CD4/CD8)<sup>+</sup>; CD45R–(B220)<sup>–</sup>; GAM<sup>–</sup>; RAM KAPPA<sup>–</sup>; IgD<sup>–</sup>; IgM<sup>–</sup>; immunophenotypes CD4<sup>–</sup>CD8<sup>+</sup> and (CD4/CD8)<sup>–</sup> were not detected. Bone marrow: CD90.2<sup>+</sup>; (CD4/CD8)<sup>+</sup> or (CD4/CD8)<sup>–</sup> or CD4<sup>+</sup>CD8<sup>–</sup>. Immunophenotype of neoplastic cells in thymus corresponded with immunophenotype of neoplastic cells in lymph nodes and bone marrow.

Cytogenetic studies revealed numerical and structural aberrations.

Precursor T–cell lymphoblastic lymphoma (Pre–T LBL) diagnosed in the WOM/W mice shows histologic and immunophenotypic similarities to Pre–T LBL observed in children and may be considered as mouse counterpart of that human lymphoma. Due to the high incidence of spontaneously developed T–cell lymphomas, WOM/W mice could be recommended to some studies of lymphoid neoplasms instead of mouse strains required radiation to induce lymphoma.

## Zastosowanie klasyfikacji WHO (2003) nowotworów macicy u kobiet do diagnostyki mysich nowotworów macicy – wkład do tworzenia mysich modeli

H. SZYMAŃSKA<sup>1</sup>, J. LECHOWSKA – PISKOROWSKA<sup>1</sup>, E. BAKUŁA – ZALEWSKA<sup>2</sup>,  
E. KRYSIAK<sup>1</sup>, E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA<sup>1</sup>

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie, <sup>1</sup> Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych, <sup>2</sup> Zakład Patologii

Nowotwory wywodzące się z błony śluzowej macicy, diagnozowane jako rak endometrium stanowią większość nowotworów trzonu macicy u kobiet. Nowotwory trzonu macicy wywodzące się z tkanki mezenchymalnej są heterogenną grupą pod względem histologii i rokowania. Obejmują często spotykane, łagodne mięśniaki (*leiomyoma*) i rzadko występujące złośliwe mięsaki (3–8% wszystkich nowotworów macicy u kobiet). Wśród mięsaków narządu płciowego kobiet najczęściej diagnozowane są *leiomyosarcoma* (*LMS*) i *endometrial stromal sarcoma* (*ESS*). Potrzeba poznania patofizjologii nowotworów trzonu macicy, wymusza tworzenie mysich modeli tych nowotworów. Spontaniczne nowotwory trzonu i rogów macicy rzadko powstają u myszy, a niewielki ich procent diagnozowany jest jako złośliwe guzy mezenchymalne.

Celem badań była ocena przydatności klasyfikacji WHO (2003) nowotworów macicy u ludzi do rozpoznania odpowiadających im zmian u myszy. Obserwowano 483 samice z 8 szczepów wsobnych. Stwierdzono 29 przypadków nowotworów trzonu i rogów macicy. Po zastosowaniu kryteriów używanych do diagnozy nowotworów macicy u kobiet, w 18 przypadkach zdiagnozowano guzy pochodzenia nabłonkowego bez cech złośliwości – *adenoma*. U myszy ze szczepów 129S1/SvW i DBA/2W, zdiagnozowano 11 przypadków jako mięsaki, w tym 10 przypadków *ESS* o niskim stopniu złośliwości, i 1 przypadek guza o wysokiej złośliwości *leiomyosarcoma*. Nie stwierdzono *ESS* o wysokim stopniu złośliwości. Podobieństwa w obrazie histologicznym mięsaków *ESS* rozwiniętych u myszy i u kobiet dotyczyły charakterystycznego przenikania błony mięśniowej macicy przez komórki nowotworowe, występowania komórek piankowatych, obecności naczyń otaczających guz. Monotonny rozrost nowotworowy wskazywał na guzy o niskiej złośliwości. *Leiomyosarcoma* – guz o wysokiej złośliwości charakteryzował się atypią komórek, wysokim indeksem mitotycznym, oraz obszarami nekrozy. Podobny był również profil histochemiczny i immunohistochemiczny badanych guzów. Klasyfikacja WHO (2003) dotycząca nowotworów macicy u kobiet jest przydatna do diagnozowania odpowiadających im zmian u myszy.



## **Adaptation of (2003) WHO classification of human uterine tumors to diagnose the cognate mouse tumors – contribution to mouse modeling**

H. SZYMAŃSKA<sup>1</sup>, J. LECHOWSKA – PISKOROWSKA<sup>1</sup>, E. BAKUŁA – ZALEWSKA<sup>2</sup>, E. KRYSIAK<sup>1</sup>, E. WIRTH – DZIĘCIOŁOWSKA<sup>1</sup>

*Maria Skłodowska–Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw*

*1 Department of Genetics and Laboratory Animal Breeding*

*2 Department of Pathology*

Most uterine corpus neoplasms, diagnosed in women, are epithelial tumors–carcinomas. Mesenchymal tumors are represented but not limited to leiomyomas and uterine sarcomas and are the heterogeneous group with regards to malignancy, histology and prognosis. While benign leiomyomas are frequently diagnosed, uterine sarcomas: leiomyosarcomas (LMS) and endometrial stromal sarcomas (ESS) comprise only 3–8% of all uterine malignances. The value of mouse models in studying human uterine corpus tumors is obvious. The most important are models of rare tumors – LMS and ESS. Although, spontaneous malignant uterine mesenchymal tumors in mice are very rare, they can serve to establish microscopic criteria for comparing tumor pathology in human and mouse. The aim of our study was to adapt the diagnostic criteria from 2003 WHO Guidelines to describing the cognate mouse tumors. 483 mice from 8 inbred strains were observed and 29 cases of uterine tumors were found. 18 cases appeared to be epithelial tumors diagnosed as adenoma. 11 cases of mesenchymal tumors developed mainly in 129S1/Sv and DBA/2W mice were diagnosed as low grade endometrial sarcomas (10 cases) and leiomyosarcoma (1 case). High grade endometrial sarcomas were not observed. Similarities between mouse and human endometrial stromal sarcoma were found in pathological features like: permeation of myometrium as irregular tongues by neoplastic cells resembling endometrial stromal cells, foamy cells and spiral arterioles in the tumor. Cellular monotony in the examined endometrial stromal sarcomas indicated on low grade tumors. Leiomyosarcoma– high grade tumor– showed high mitotic index, cellular atypia and contained characteristic tumor cell necrosis. Immunohistochemical and histochemical profiles of mouse uterine mesenchymal tumors were consistent with their human counterparts. We conclude that criteria for classification of human uterine tumors match those used when describing mouse uterine tumors.

## Weryfikacja hipotezy o ewolucyjnej preferencji lekko sfermentowanego pokarmu u zwierząt na przykładzie *Achatina fulica*

K. RĄCZY<sup>1</sup>, M. SZELAĞOWSKA<sup>1</sup>, A. REINHOLZ – TROJAN<sup>1</sup>, K. ZIĘBA<sup>1</sup>, P. KOCZOŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup>Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Teoria biologii ewolucyjnej dotycząca uzależnień od alkoholu i środków psychoaktywnych w dużej mierze jest poświęcona adaptacji i uzależnieniu zwierząt od konsumpcji owoców zawierających alkohol etylowy. Coraz częściej badania takie przeprowadza się także na bezkręgowcach. Po pierwsze, jest to efektem odkrycia, iż pomimo różnic w genetyce, behawiorze oraz neurochemii, podobnie jak kręgowce reagują na środki psychoaktywne. Po drugie, ze względu na znacznie uproszczoną (w stosunku do kręgowców) budowę układu nerwowego, dzięki czemu potencjalnie łatwiej jest wyjaśnić podstawy rozwoju uzależnień na tych organizmach wraz ze stojącymi za nimi procesami biochemicznymi.

W przeprowadzonym badaniu podjęto próbę zmierzenia preferencji pokarmów sfermentowanych u sześciu ślimaków olbrzymich (*Achatina fulica*). Każdego osobnika wkładano pojedynczo na 24 godziny do akwarium eksperymentalnego, w którym były umieszczone 3 szalki zawierające pokarm o zróżnicowanym poziomie fermentacji: niesfermentowany (nie zawierający roztworu etanolu), lekko sfermentowany (4% roztwór etanolu) oraz mocno sfermentowany (8% roztwór etanolu). Mocno sfermentowany pokarm miał wyższy poziom alkoholu niż spotykany w naturze – najwyższe potwierdzone laboratoryjnie stężenie alkoholu w owocach wynosi 7% roztworu etanolu. Każdy ze ślimaków został przebadany w teście pięciokrotnie w tygodniowych odstępach.

Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu znaków wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy: ilością spożywanego pokarmu niesfermentowanego oraz lekko sfermentowanego  $Z=2,008$ ;  $p=0,045$ ; lekko sfermentowanego oraz sfermentowanego  $Z=2,739$ ;  $p=0,006$ , a także niesfermentowanego oraz sfermentowanego  $Z=3,104$ ;  $p=0,002$ . Wyniki wskazują na wyraźną preferencję sfermentowanego pokarmu. Im wyższe było stężenie roztworu etanolu w pokarmie tym chętniej był zjadany przez ślimaki.

## **Verification hypothesis of an evolutionary preference slightly fermented food in animals on the example of *Achatina fulica***

K. RAĆZY<sup>1</sup>, M. SZELAĞOWSKA<sup>1</sup>, A. REINHOLZ – TROJAN<sup>1</sup>, K. ZIĘBA<sup>1</sup>, P. KOCZOŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*University of Warsaw*

<sup>2</sup>*Warsaw University of Life Sciences*

Theory of the evolutionary biology of addiction to alcohol and psychoactive drugs is largely devoted animals to adapting and addiction the from consumption of fruit which containing ethyl alcohol. Increasingly, such research is carried out also on invertebrates. Firstly, it is a result of the discovery that, despite differences in genetics, and neurochemistry behaviour, like vertebrates respond to psychoactive substances. Secondly, because of the much simplified (compared to vertebrates) construction of the nervous system so that potentially it is easier to explain the basis for the development of dependence on these organisms, together with standing behind them biochemical processes.

The study attempted to measure the pREFERENCES of fermented foods in six giant snail (*Achatina fulica*). Each individual were placed singly for 24 hours to the experiment aquarium, in which were placed 3 Petri dishes containing foods with different levels of fermentation: unfermented (containing no ethanol solution), slightly fermented (4% ethanol solution) and strongly fermented (8% ethanol solution). Heavily fermented foods have higher levels of alcohol than those found in nature – the highest laboratory–confirmed alcoholic fruit is 7% ethanol solution. Each snail was tested in the test five times at weekly intervals.

Statistical analysis using the sign test showed a statistically significant difference between: the amount of foods consumed unfermented and lightly fermented  $Z = 2.008$ ,  $p = 0.045$ , slightly fermented and fermented  $Z = 2.739$ ,  $p = 0.006$ , as well as unfermented and fermented  $Z = 3.104$ ,  $p = 0,002$ . The results show a clear preference for fermented food. The higher concentration of ethanol in food the more likely it was eaten by the snails.

## **Wykorzystanie zwierząt w badaniach produktów leczniczych – przeszłość czy konieczność?**

I. KSIĄŻEK, J. DUDKIEWICZ – WILCZYŃSKA

*Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, Polska*

W badaniach produktów leczniczych zwierzęta laboratoryjne wykorzystywane są głównie na etapie badań przedklinicznych oraz w kontroli jakości biologicznych produktów leczniczych, dopuszczonych do obrotu. Aktywność substancji czynnej jest wypadkową interakcji z całym organizmem. Dlatego też, przed zastosowaniem leku u ludzi, niezwykle ważne jest przetestowanie go na żywym organizmie. Badania przedkliniczne dotyczą oceny toksykologicznej, biodystrybucji narządowej i farmakokinetyki. Wraz z postępem naukowo-technicznym niektóre testy wykonywane na zwierzętach udało się zastąpić przez np. modelowanie komputerowe czy badania *in vitro*. Wprowadzenie nieinwazyjnych metod diagnostyki (rezonans magnetyczny, PET) także wpłynęło na znaczące ograniczenie zużycia zwierząt doświadczalnych.

W kontroli jakości leków jeszcze w latach 90-tych XX wieku, w Zakładzie Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowego Instytutu Leków, zwierzęta wykorzystywano w badaniu tożsamości i aktywności biologicznej produktów leczniczych, zawierających jako substancję czynną: insulinę, erytropoetynę, kalcytoninę, oksytocynę, prolaktynę, hormon wzrostu oraz lutropinę, choriogonadotropiny, folikulotropiny. Rozwój biotechnologii i jej zastosowanie do otrzymywania techniką inżynierii genetycznej aktywnych farmakologicznie ludzkich białek rekombinowanych, będących homogennymi cząsteczkami, o ściśle określonej budowie, umożliwiło ich selektywne oznaczanie metodami alternatywnymi. Najczęściej wykorzystywanymi są techniki chromatograficzne, elektroforetyczne i spektrofotometryczne. Obecnie nadal stosuje się zwierzęta w ocenie jakości erytropoetyny i białkowych hormonów płciowych tj. hCG, FSH, LH, hMG i PMSG. Głównym tego powodem jest heterogenna budowa komponenty cukrowej rekombinowanych glikoprotein (rhEPO, rhLH, rhFSH). Część z nich w dalszym ciągu otrzymywana jest w postaci organopreparatów.

Pomimo osiągnięć współczesnej nauki, wychodzącej naprzeciw zdefiniowanej przez Russell'a i Burch'a, zasadzie 3R tj. Replacement – zastąpienie badań na zwierzętach przez inne metody badawcze, Reduction – zmniejszenie liczby zwierząt w eksperymencie i Refinement – doskonalenie procedur celem zmniejszenia cierpienia zwierząt, ciągle nie ma możliwości całkowitego wyeliminowania udziału zwierząt i konieczne jest ich wykorzystywanie w badaniach biomedycznych.

## **The use of animals in medicinal products analyses – past or necessity?**

I. KSIĄŻEK, J. DUDKIEWICZ – WILCZYŃSKA

*The National Medicines Institute 30/34 Chełmska Str., 00–725 Warsaw, Poland*

In medicinal products analyses laboratory animals are mainly used at the stage of preclinical research and in the quality control of the medicinal products admitted to trading. The activity of the active substance is the resultant of the interaction with the whole organism. Therefore, before using the medicine by people, it is extremely important to test it on a living organism. The preclinical tests concern toxicological assessment, organ biodistribution and pharmacokinetics. Together with the scientific–technological development, some tests carried out on animals were successfully replaced by e.g. computer modelling or *in vitro* tests. The introduction of noninvasive methods of diagnostics (electromagnetic resonance, PET) has also drastically influenced the limitation of the use of experimental animals.

In the quality control of the medicinal products in the 90s of the 20th century, in the Department of Biochemistry and Biopharmaceuticals of the National Medicines Institute, animals were used while testing the identity and activity of medicinal products containing as the active substance: insulin, erythropoietin, calcitonin, oxytocin, prolactin, growth hormone and lutropin, choriogonadotropins, folliculotropins. The development of biotechnology and applying it to obtain, using genetic engineering, pharmacologically active human recombinant proteins, being homogenic particles of a strictly specific build, made it possible to mark them selectively with the use of alternative methods. The most often used of those are chromatographic, electrophoretic and spectrophotometric techniques. Presently, animals are still used to assess the quality of erythropoietin and protein sex hormones, that is hCG, FSH, LH, hMG and PMSG. The main reason for that is the heterogenic build of the sugar component of recombinant protein (rhEPO, rhLH, rhFSH). Some of them are still obtained in the form of organ–preparations.

Despite the achievements of temporary science, meeting halfway the rule of three Rs defined by Russell and Burch, that is Replacement – replacing tests on animals with other research methods, Reduction – reducing the number of animals in the experiment and Refinement – refining the procedures in order to diminish the animals' suffering, there is still no possibility to eliminate totally the use of animals and it is necessary to use them in biomedical research.

## **Zastosowanie nerek świń do badania skuteczności płynów do przeszczepów**

B. DOLIŃSKA<sup>1,2</sup>, A. CABAN<sup>3</sup>, A. OSTRÓŻKA – CIEŚLIK<sup>2</sup>, F. RYSZKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>"Biochefa" Farmaceutyczny Zakład Naukowo – Produkcyjny, 41–205 Sosnowiec, Kasztanowa 3

<sup>2</sup>Wydział Farmaceutyczny, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, 41–205 Sosnowiec, Kasztanowa 3

<sup>3</sup>Oddział Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Transplantacyjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, 40–027 Katowice, Francuska 20

Większość osiągnięć w dziedzinie transplantologii zawdzięczamy eksperymentalnym przeszczepom wykonywanym na zwierzętach. Często wykorzystywanymi zwierzętami są szczury i psy, które odzwierciedlają zbliżone do rzeczywistych warunki panujące u człowieka. Należy zwrócić jednak uwagę na fakt, że występują znaczne różnice między ich anatomią i fizjologią w stosunku do człowieka. Wykorzystanie małych zwierząt najbliższych spokrewnionych z ludźmi budzi duże wątpliwości natury etycznej, również względy ekonomiczne wykluczają wykorzystanie tych zwierząt na szeroką skalę. Najbardziej wskazanym zwierzęciem modelowym wydaje się być świnia. Jej organy są zbliżone wielkością do ludzkich i są do nich podobne pod względem fizjologicznym. Ponadto istnieją opracowane procedury modelowego przeszczepienia nerek, wątroby, trzustki i jelita cienkiego z wykorzystaniem tych zwierząt.

Nasz zespół wykorzystał izolowane nerki świni rasy Wielka Biała Polska do badania skuteczności płynu Biolasol®, przeznaczonego do przeszczepiania narządów. Jako modelowy płyn odniesienia zastosowano HTK. Wskaźnikami skuteczności opracowanego płynu było pH oraz LDH. Badanie pH jest jednym z najważniejszych wyznaczników homeostazy organizmu pod względem zachowania równowagi kwasowo–zasadowej. Ilość uwolnionego LDH wskazuje na możliwości postępującego zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego.

Stwierdzono, że w przypadku HTK po 48 godzinach przechowywania, pH płynu perfundującego spada do wartości 6,3. Wskazuje to na kwasicę metaboliczną zagrażającą życiu. 48 – godzinna rezerwacja nerek płynem Biolasol utrzymuje wartość pH na poziomie 7,1. Zaobserwowano również, że ilość uwolnionego LDH do płynu Biolasol® jest o 45% mniejsza w porównaniu z płynem HTK.

Płyn Biolasol® wpływa pozytywnie na utrzymanie prawidłowej homeostazy przechowywanych przed przeszczepieniem nerek świń.

Praca została wykonana w procesie realizacji projektu rozwojowego No. PBZ–KBN–12 0036 06/2009.

## The use of porcine kidneys for testing the effectiveness of preservation and perfusion solutions

B. DOLIŃSKA<sup>1,2</sup>, A. CABAN<sup>3</sup>, A. OSTRÓŻKA – CIEŚLIK<sup>2</sup>, F. RYSZKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>"Biocheffa" Pharmaceutical Research and Production Plant, 41–205 Sosnowiec, Kasztanowa 3

<sup>2</sup>Department of Applied Pharmacy, Medical Academy University of Silesia, 41–205 Sosnowiec, Kasztanowa 3

<sup>3</sup>Department of General, Vascular and Transplant Surgery, Medical Academy University of Silesia, 40–027 Katowice, Francuska 20

Most of the achievements in transplantology are made due to experimental transplantations in animals. Dogs and rats are often used as model animals to mimic human body. However major differences between human and those species can be observed in terms of anatomy and physiology. The use of monkeys, being the closest human relatives, raises ethical concerns, economic matters also make monkeys improper for such experiments. Pigs emerge as model animals. Porcine organs are similar in size and physiology to human organs. Procedures for model transplantation of kidney, liver, pancreas and the small intestine already exist for pigs.

Our team used *ex vivo* porcine kidneys, Polish Great White race, for testing the effect of Biolasol® preservation solution. HTK solution was used as a standard. PH and LDH values were used to measure the effectiveness of fluids. The pH value is one of the most important indicators of the acid–base homeostasis. The amount of released LDH indicates a possibility of advancing intracellular acidosis.

A decrease in pH of the solution to the value of 6,3 was observed in HTK after 48 h of preservation. This suggests a metabolic acidosis which may be lethal. After 48 h of preservation using Biolasol® solution pH remains at a level of 7,1. The amount of released LDH is 45% lower for Biolasol® in comparison to HTK.

The Biolasol® solution has a positive effect on homeostasis in porcine kidneys preserved for transplantation.

The work was carried out as a project for development No. PBZ–KBN–12 0036 06/2009.

## Ocena czynności globalnej lewej komory serca w mysim modelu Tgαq\*44 przy pomocy obrazowania magnetyczno – rezonansowego

M. JABŁOŃSKA<sup>1,2</sup>, U. TYRANKIEWICZ<sup>1</sup>, T. SKÓRKA<sup>1</sup>, S. CHŁOPICKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN, Zakład Tomografii Magnetyczno–Rezonansowej, Kraków

<sup>2</sup> AGH Akademia Górniczo–Hutnicza, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki, Kraków

<sup>3</sup> Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego, Katedra Farmakologii Wydziału Lekarskiego, Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Kraków

Myszy Tgαq\*44 stanowią unikatowy zwierzęcy model, w którym na skutek nadekspresji podjednostki  $\alpha$  białka G selektywnie w kardiomiocytach dochodzi do upośledzenia czynności lewej komory i rozwoju fenotypu kardiomiopatii rozstrzeniowej podobnego do tego, jaki obserwuje się u ludzi. Celem pracy było porównanie globalnej oraz regionalnej czynności lewej komory serca u myszy Tgαq\*44 na różnych etapach rozwoju dysfunkcji przy zastosowaniu techniki obrazowania magnetyczno–rezonansowego (MR).

Czynność regionalną szacowano na podstawie obrazów pojedynczej warstwy w projekcji osi krótkiej na wysokości mięśni brodawkowatych, natomiast globalną na podstawie obrazów przekrojów komory mierzonych warstwa po warstwie od koniuszka po koronę serca. Szacowano parametry lewej komory takie jak: objętość/powierzchnię końcowo skurczową i rozkurczową, rzut serca obliczany z objętości całej komory oraz warstwy, a także frakcję wyrzutową lewej komory i jej regionalny odpowiednik: odcinkową zmianę powierzchni warstwy (FAC).

Wyniki pomiarów regionalnych oraz objętościowych wykazały zgodność we wszystkich badanych parametrach na wszystkich etapach rozwoju niewydolności serca u myszy Tgαq\*44, pomimo znacznych różnic w kondycji serca zależnych od stopnia rozwoju patologii. Uzyskana zgodność pozwala stosować znacznie krótsze protokoły pomiarowe (wykonywane na jednej warstwie, na poziomie mięśni brodawkowatych). Ograniczenie czasu badania w obrazowaniu MR pozwala z kolei zredukować niepotrzebne wydłużenie czasu anestezji oraz umożliwia przeprowadzanie badań eksperymentalnych z zastosowaniem leków o bardzo krótkim czasie działania (np. protokół z testem wysiłkowym przy użyciu dobutaminy, który pozwala szacować rezerwę czynności niewidoczną w warunkach spoczynkowych).

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (projekt nr WND–POIG.01.01.02–00–069/09–00 koordynowany przez JCET–UJ).



## CMR–based assessment of global left ventricle function in murine model of non–ischemic heart failure (Tg $\alpha$ \*44 mice)

M. JABŁOŃSKA<sup>1,2</sup>, U. TYRANKIEWICZ<sup>1</sup>, T. SKÓRKA<sup>1</sup>, S. CHŁOPICKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Henryk Niewodniczanski Institute of Nuclear Physics PAN, Department of Magnetic Resonance Imaging, Krakow, Poland

<sup>2</sup>AGH University of Science and Technology, Faculty of Physics and Applied Computer Science, Department of Medical Physics and Biophysics, Krakow, Poland

<sup>3</sup>Jagiellonian University Medical College, Department of Experimental Pharmacology, Krakow, Poland

The Tg $\alpha$ \*44 strain is an unique model of dilated cardiomyopathy, where the overexpression of cardiac specific subunit  $\alpha$  of the G protein in cardiomyocytes mimics pathogenesis in humans and leads to cardiac remodeling and heart failure. In this study global and regional left ventricle function in Tg $\alpha$ \*44 mice was assessed at different stages of cardiac pathology with the use of *in vivo* Cardiac Magnetic Resonance Imaging (CMR).

Regional cardiac function was estimated from the midventricular single slice images in short axis projection, and global function was assessed according to the LV cross–sections measured slice by slice from the apex to the heart base. Parameters related to remodeling as ESV (End–Diastolic Volume), EDV (End–Systolic Volume), SV (Stroke Volume) and to cardiac function, as: EF (Ejection Fraction) and its regional equivalent FAC (Fractional Area Change) were estimated and compared to the control group.

Good correlation between cardiac function from one midventricular slice and from whole chamber in mice developing advanced cardiac impairment and left ventricle dilation allow reducing CMR protocol and time of measurements related with e.g. unwanted anesthesia complication. Shortened protocol is also necessary and essential for the measurements of the cardiac function influenced by specific drugs with very short life–time, e.g. under commonly performed dobutamine stress–tests which reveal cardiac reserve unseen at rest condition. Changes in volumetric parameters unmask additionally LV shape remodeling and dysfunction progression at different stages of pathology development.

### Acknowledgments

This work was supported by European Regional Development Fund from European Union (grant coordinated by JCET–UJ, No WND–POIG.01.01.02–00–069/09–00).

## **Technika implantacji sztucznego stymulatora serca u świni domowej w modelu przewlekłej niewydolności serca indukowanej tachykardią**

A. JANISZEWSKI<sup>1</sup>, U. PASŁAWSKA<sup>2</sup>, J. GAJEK<sup>3</sup>, P. SKRZYPCZAK<sup>2</sup>,  
A. NOSZCZYK – NOWAK<sup>2</sup>, D. ZOŚKO<sup>3</sup>, L. KICZAK<sup>2</sup>, J. BANIA<sup>2</sup>, A. TOMASZEK<sup>1,3</sup>,  
M. ZACHARSKI<sup>1,2</sup>, J. NICPOŃ<sup>2</sup>, W. BANASIAK<sup>3</sup>, E. JANKOWSKA<sup>3</sup>, P. PONIKOWSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu Ośrodek Badawczo – Rozwojowy

<sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

<sup>3</sup>Akademia Medyczna we Wrocławiu

Aktualnie w modelach badawczych dotyczących niewydolności serca coraz bardziej docenia się świnię jako zwierzęta wykazujące największy stopień podobieństwa do człowieka w funkcjonowaniu i budowie serca oraz innych narządów i układów biorących udział w przebiegu choroby.

Tachykardiomiopatia stymulatorowa umożliwia bardzo dokładne śledzenie zmian zachodzących w organizmie w przebiegu ostrej lub przewlekłej niewydolności serca, jak również pozwala na badanie procesów naprawczych po zaprzestaniu stymulacji, oraz wpływu farmakoterapii przy leczeniu lub prewencji niewydolności serca.

### Cele i Metody

Wszczepiany układ stymulujący stanowiła bipolarna, wkręcana elektroda endokawitarna CAPSUREFIX NOVUS 58 cm (Medtronic Inc.) oraz stymulator jednojamowy SENSIA SESR01 (Medtronic Inc.). Dostęp chirurgiczny uzyskiwano z cięcia o długości około 8 cm po prawej stronie szyi wzdłuż linii przeprowadzonej pomiędzy kątem żuchwy a stawem barkowym. Po wypreparowaniu żyły szyjnej zewnętrznej podwiązywano ją w dystalnym odcinku a następnie po nacięciu naczynia pod kontrolą fluoroskopu wprowadzano elektrodę do prawej komory serca, gdzie była wkręcana w okolicy koniuszka. W następnym etapie wykonywano łożę dla stymulatora pomiędzy warstwami mięśni szyi, dogrzbietowo od linii cięcia.

### Wyniki i wnioski

Do tego momentu przeprowadzono zabieg implantacji u 51 zwierząt. Nie odnotowano w tym czasie żadnych komplikacji w okresie okołoperacyjnym, co świadczy o bezpieczeństwie i skuteczności opisywanej metody. U zwierząt o masie ciała powyżej 100 kg pewne problemy sprawia wypreparowanie z tak małego cięcia żyły szyjnej zewnętrznej, co powoduje wydłużanie czasu trwania zabiegu ( z średnio 45 min. do 1 godz. 15 min).

## **The technique of cardiac pacemaker implantation in domestic swine as a model of chronic tachycardia–induced cardiomyopathy**

A. JANISZEWSKI<sup>1</sup>, U. PASŁAWSKA<sup>2</sup>, J. GAJEK<sup>3</sup>, P. SKRZYPCZAK<sup>2</sup>,  
A. NOSZCZYK – NOWAK<sup>2</sup>, D. ZOŚKO<sup>3</sup>, L. KICZAK<sup>2</sup>, J. BANIA<sup>2</sup>, A. TOMASZEK<sup>1, 3</sup>,  
M. ZACHARSKI<sup>1, 2</sup>, J. NICPON<sup>2</sup>, W. BANASIAK<sup>3</sup>, E. JANKOWSKA<sup>3</sup>, P. PONIKOWSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Regional Specialist Hospital in Wrocław R&D*

<sup>2</sup>*Wrocław University of Environmental and Life Sciences*

<sup>3</sup>*Wrocław Medical University*

**Background:** Currently, pigs are increasingly appreciated as excellent models for medical research of heart failure as these animals show the greatest degree of similarity between them and humans in the anatomy and function of the heart and other organs and systems involved in the natural course of the disease.

Stimulator–induced cardiomyopathy allows very accurate tracking of changes in the body in both acute or chronic heart failure, and also allows the study of repair processes after the cessation of stimulation as well as the study of impact of pharmacotherapy in the treatment or prevention of heart failure.

**Methods:** Single chamber pacemaker SENSIA SESR01 (Medtronic Inc.) was implanted with bipolar, screw–in endocavitary electrode CAPSUREFIX NOVUS 58 cm (Medtronic Inc.). Surgical access was obtained by ca. 8–cm incision on the right side of the neck along a line between the angle of the jaw and shoulder joint.

After dissection of the external jugular vein it was ligated at distal end to planned cutting place and then the vessel was cut. The endocavitary electrode was implanted under fluoroscopic control into the right ventricle, where it was screwed around the apex. Next the compartment for the pacemaker between the layers of the muscles of the neck, dorsally from the cutting line was prepared.

**Results:** The implantation procedure has been carried out in 51 animals so far. At that time there were no complications in the perioperative period, which proves the safety and efficacy of the described method. In animals weighing over 100 kg dissection of external jugular vein from such a tiny incision caused some problems, which results in increased duration of surgery (from an average of 45 min to 1 hr 15 min).

## **Analiza cytogenetyczna szynszyli hodowlanej *Chinchilla lanigera* Mol.**

M. KUCHTA<sup>1</sup>, A. GRABOWSKA – JOACHIMIAK<sup>2</sup>, O. SZELESZCZUK<sup>1</sup>,  
P. NIEDBAŁA<sup>3</sup>, T. ILNICKI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt; Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Kraków, Polska

<sup>2</sup>Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa; Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Kraków, Polska

<sup>3</sup>Katedra Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny; Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Kraków, Polska

<sup>4</sup>Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki; Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

Diploidalna liczba chromosomów u *Chinchilla lanigera* Mol. (Rodentia, Chinchillidae) wynosi  $2n = 64$ . Nieliczne badania kariotypu u tego gatunku wskazują na występowanie 60 meta- i 2 submetacentrycznych autosomów. Metacentryczny chromosom X, największy w kompleksie, określany jest jako „podwójnego–typu X”, natomiast submetacentryczny chromosom Y należy do grupy najmniejszych chromosomów. Informacji na temat badań cytogenetycznych prowadzonych z zastosowaniem metod różnicowego barwienia chromosomów szynszyli jest bardzo niewiele.

Przeprowadzone przez nas analizy dotyczące rozmieszczenia heterochromatyny u szynszyli z wykorzystaniem techniki CBG (C–banding) oraz jej fluorescencyjnej modyfikacji C–banding/DAPI, wykazały występowanie przycentromerowych prążków C na wszystkich autosomach oraz na chromosomie X. Dodatkowo, na chromosomie X zlokalizowano dwa heterochromatynowe segmenty położone interkalarnie, natomiast chromosom Y miał prawie wyłącznie heterochromatynowy charakter (Kuchta et al. 2010).

W dalszym etapie badań nad strukturą kompleksu chromosomowego u szynszyli, analizy cytogenetyczne poszerzono o kolejne metody: GTG (G–banding) oraz srebrzenie (Ag–NORs). Srebrzenie azotanem srebra ujawniło obecność aktywnych, różniących się wielkością organizatorów jąderek w obrębie jednej pary dużych autosomów. W jądrach interfazowych obserwowano zwykle dwa lub rzadziej jedno jąderko. Na podstawie morfologii i wzoru prążków G, chromosomy zestawiono w pary homologiczne i opracowano kariogram.

Uzyskane przez autorów wyniki mogą stanowić przyczynek w kierunku opracowania kariotypu wzorcowego dla szynszyli hodowlanej.

## **Cytogenetic study of *Chinchilla lanigera* Mol.**

M. KUCHTA<sup>1</sup>, A. GRABOWSKA – JOACHIMIAK<sup>2</sup>, O. SZELESZCZUK<sup>1</sup>,  
P. NIEDBAŁA<sup>3</sup>, T. ILNICKI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Department of Animal Reproduction and Anatomy; University of Agriculture in Krakow, Kraków, Poland*

<sup>2</sup>*Cytogenetics Group in the Department of Plant Breeding and Seed Science, University of Agriculture in Krakow, Kraków, Poland*

<sup>3</sup>*Department of Small Animal Breeding, Animal Hygiene and Breeding Environment, University of Agriculture in Krakow, Kraków, Poland*

<sup>4</sup>*Department of Plant Cytology and Embryology, Institute of Botany, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

*Chinchilla Chinchilla lanigera* Mol. (Rodentia, Chinchillidae) has a diploid chromosome number of  $2n = 64$ . Few studies on this species' karyotype carried out so far show the occurrence of 60 meta- and 2 submetacentric autosomes. Metacentric chromosome X, the biggest one in the complex, is described as „duplicate-type X”, whereas the submetacentric chromosome Y belongs to the group of the smallest chromosomes. An international model of chinchilla karyotype has not yet been determined, as the data on differential staining methods of chromosomes in this species are extremely scarce. Our previous cytogenetic studies based on C-banding (CBG) and its fluorescent modification (C-banding/DAPI) revealed mainly centromeric distribution of heterochromatin on autosomes, interstitial and centromeric C- positive bands on the X chromosome and almost entirely heterochromatic nature of the Y chromosome (Kuchta et al. 2010).

We have broadened cytogenetic analysis of chinchilla with other methods: G – banding and Ag-NORs (silver staining of NORs). The latter one has demonstrated the presence of two active nucleolar regions (NORs) of different sizes within one pair of big autosomes. In interphase nuclei two nucleoli or, less frequently, one silver stained nucleolus have been observed. In respect of morphology and G-banding patterns, chinchilla chromosomes were arranged in homologous pairs and a G-banded karyotype was prepared.

The results obtained could be the first step towards determination of the standard karyotype for breeding chinchilla.

## Optimalizacja testu wzrostu masy macicy i testu Hershbergera na chomikach z użyciem związków modelowych

L. RADKO, M. MINTA, S. STYPUŁA – TRĘBAS, J. ŻMUDZKI

Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,  
Al. Partyzantów 57, 24–100 Puławy

Dwa krótkoterminowe testy (wzrostu macicy i Hershbergera) należą do najczęściej stosowanych do wykrywania związków (anty)estrogennych i (anty)androgennych *in vivo*. Preferowane jest wykonywanie obu testów na młodych, niedojrzałych osobnikach niewymagających zabiegów chirurgicznych (kastracja).

W celu wykorzystania chomika, jako nowego modelu dla obu testów wykonano badania na 18 dniowych samicach i 25 dniowych samcach chomika złocistego (*Mesocricetus auratus*) hodowli własnej z udziałem 4 związków modelowych: 17 $\alpha$  etnyloestradiolu (EE<sub>2</sub>), tamoksifenu (TAM), propionianu testosteronu (TP) i flutamidu (FL). Zwierzęta przebywały w klatkach polipropylenowych (TECNIPLAST) w pomieszczeniach o ustalonych warunkach środowiskowych: czas oświetlenia – 14 godzin, temp. otoczenia 20  $\pm$  2°C, wilgotność względna 30–70%. Wodę i paszę (Altromin 7010) podawano zwierzętom *ad libitum*.

Samicom przez 3 kolejne dni podawano *s.c.* EE<sub>2</sub> w dawkach: 0,1; 0,3; 0,6; 1; 3; 10 i 100  $\mu$ g/kg m.c./dzień lub TAM w dawkach: 0,1; 0,5; 1; 2 mg/kg z równoczesnym podaniem EE<sub>2</sub> (1 $\mu$ g/kg.). Działanie estrogenne (istotny wzrost masy macicy „mokrej” i „suchej”) stwierdzono od dawki EE<sub>2</sub>  $\geq$  0,6  $\mu$ g/kg; antyestrogenne (istotne zmniejszenie masy macicy) TAM zaobserwowano od dawki  $\geq$  1 mg/kg.

Samcom przez 10 kolejnych dni podawano *s.c.* TP w dawkach: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8, 1,6 mg/kg lub *p.o.* FL (0,1; 0,3; 1; 3 i 10 mg/kg ) z równoczesnym podawaniem TP (0,4 mg/kg). Działanie androgenne TP (istotny wzrost masy prostaty, pęcherzyków nasiennych i mięśnia opuszkowo–gąbczastego) zaobserwowano po dawce  $\geq$  0,2 mg/kg; antyandrogenne FL (istotne zmniejszenie masy prostaty, pęcherzyków nasiennych i gruczołów opuszkowo–cewkowych) – po dawce  $\geq$  0,3 mg/kg.

Badania realizowane w ramach projektu badawczego MNiSW N N308 267238

## Optimization of hamster uterotrophic and Hershberger assays with use of model compounds

L. RADKO, M. MINTA, S. STYPUŁA – TRĘBAS, J. ŻMUDZKI

*Department of Pharmacology & Toxicology, National Veterinary Research Institute  
Partyzantów 57, 24–100 Pulawy, Poland*

Two short term *in vivo* methods (uterotrophic and Hershberger assays) are the most frequently used to study (anti)estrogenic and (anti)androgenic activity of compounds. To avoid castration, premature animals are preferable.

To adapt golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model 18–day–old females and 25–day–old males of own breeding were used. Four model compounds were evaluated: 17 $\alpha$ –ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>), tamoxifen (TAM), testosterone propionate (TP) and flutamide (FL). The animals were housed in polypropylene cages (TECNIPLAST) in standard environmental conditions: 14 h/10 h (light/dark), room temperature 20  $\pm$  2°C, relative humidity 30–70%. Tap water and feed (Altromin 7010) were served *ad libitum*.

Females (6 per group) were dosed for 3 days *s.c.* with EE<sub>2</sub> at 0.1, 0.3, 0.6, 1, 3, 10, 100  $\mu$ g/kg b.w./day or with TAM at 0.1, 0.5, 1 and 2  $\mu$ g/kg after pretreatment with EE<sub>2</sub> (1 $\mu$ g/kg). Estrogenic effects (significant increase of wet and dry uterine weights) were detected after EE<sub>2</sub> doses of  $\geq$ 0.6  $\mu$ g/kg; antiestrogenic (significant decrease of uterine weight) of TAM – after doses of  $\geq$ 1 mg/kg.

Males (6 per group) were injected for 10 days *s.c.* with TP at the doses of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg/kg or with *p.o.* FL (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 mg/kg) after pretreatment with TP (0.4 mg/kg). Androgenic effects (significant increase of prostate, seminal vesicles, levator ani plus bulbocavernosus muscles weights) of TP were noted after the dose  $\geq$  0.2 mg/kg; antiandrogenic (significant decrease of prostate, seminal vesicles, Cowper glands weights) – after the dose FL  $\geq$  0.3 mg/kg.

*Supported by the Ministry of Scientific Research and Information Technology Grant no. N N308 267238*

## **Ludzkie blaszki miażdżycowe z tętnicy udowej przeszczepione do myszy SCID są chemoatraktantami dla makrofagów biorcy**

M. MOŚCICKA – WESOŁOWSKA<sup>1</sup>, W. L. OLSZEWSKI<sup>1,3</sup>, D. ZOLICH<sup>1</sup>, P. ANDZIAK<sup>2</sup>, M. DURLIK<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Badawczo – Leczniczy Chirurgii Transplantacyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej CSK MSWiA, Warszawa

<sup>3</sup>Klinika Chirurgii Gastroenterologicznej i Transplantologii CSK MSWiA, Warszawa

Wstęp: W świetle danych z piśmiennictwa miażdżycę tętnic może być procesem zapalnym. Powstało pytanie, czy mikroorganizmy występujące w arteriach mogą wywoływać reakcję immunologiczną.

Cel: Celem pracy było zbadanie migracji makrofagów do blaszek miażdżycowych pochodzących z tętnic udowych i podkolanowych po ich przeszczepieniu do myszy SCID.

Metody: Wycinki tętnic udowych (n=10) i podkolanowych (n=10) ze zmianami miażdżycowymi przeszczepiono podskórną w okolicę grzbietowo – boczną myszy. Po 7 dniach z każdej blaszki pobrano wycinki do określenia zawartości bakteryjnego DNA, na rutynowe badania bakteriologiczne oraz immunohistochemiczne. Wykonywano reakcje PCR używając starterów dla 16sRNA. Preparaty histologiczne blaszek pobieranych od myszy znakowano przeciwciałami monoklonalnymi na obecność HLA kl.I, HLA–DR, CD68 oraz mysich antygenów MHC kl.I i PCNA.

Wyniki: W 50% przeszczepionych fragmentów tętnic stwierdzono obecność bakterii takich jak *S.epidermidis*, *S.aureus*, *Enterococci*, 16SRNA było wykrywane w 60% tętnic udowych i podkolanowych. W preparatach histologicznych widziane były mysie makrofagi i neutrofile otaczające skupiskami przeszczepioną tkankę, część komórek penetrowała w głąb blaszki miażdżycowej. Komórki te były MHC kl.I i PCNA pozytywne. Niewielki procent nacieku wykazywał obecność antygeny HLA–DR. Minimalną reakcję komórkową stwierdzano w kontrolnych przeszczepach żylnych.

Wnioski: Ludzkie blaszki miażdżycowe wywołują znaczną reakcję mysich makrofagów, co może sugerować, że w naczyniach miażdżycowych atraktantami dla makrofagów mogą być, obok oxLDL także bakterie.



## **Atheromatic femoral artery plaques transplanted to scid mice attract macrophages**

M. MOŚCICKA – WESOŁOWSKA<sup>1</sup>, W. L. OLSZEWSKI<sup>1,3</sup>, D. ZOLICH<sup>1</sup>, P. ANDZIAK<sup>2</sup>,  
M. DURLIK<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Surgical Research & Transplantology, Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

<sup>2</sup>*Department of Vascular Surgery, Central Clinical Hospital, Ministry of Internal Affairs, Warsaw, Poland*

<sup>3</sup>*Department of Transplantation Surgery, Central Clinical Hospital, Ministry of Internal Affairs, Warsaw, Poland*

**Introduction.** There are convincing scientific data that atherosclerosis is an inflammatory process. The question arises whether the microorganisms present in arterial plaques evoke immune reaction. The functional tests would be migration of macrophages to infected plaques.

**Aim.** The aim of study was to investigate recruitment of macrophages to atheromatous plaque harvested from femoral and carotid arteries and transplanted to scid mice.

**Methods.** Femoral and carotid plaques were transplanted onto the dorsum of scid mice. DNA was extracted. PCR amplification was performed with primers for gene fragment coding bacterial 16s RNA, and for major outer membrane protein (ompA) of CP with positive and negative controls. Routine bacteriological cultures of specimens were carried out. Seven days after transplantation plaques were removed with the surrounding tissue. Specimens were stained with mAbs against human HLA I, HLA DR and CD68, and mouse MHC I, PCNA, macrophages and neutrophils

**Results.** 50% of transplanted arteries contain bacteria such as *S.epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococci*. 16SRNA was detected in 60% of the femoral and popliteal arteries. Implanted fragments of femoral and popliteal arteries were surrounded by dense accumulations of mouse macrophages and neutrophils. These cells were MHC I and PCNA+ (dividing). Very few of them were HLA DR+ (human). Infiltrates around carotid plaques were less intensive. Venous implants evoked only minor reaction.

**Conclusions.** Human atheromatous plaques evoke major reaction of mouse macrophages. Bacteria may, beside of oxLDL, be one of attractants of macrophages to atheromatous arteries.

## **Poszerzenie oceny działania uczulającego substancji chemicznych prowadzonej wg metody Buehlera o badania mikroskopowe wybranych narządów świnki morskiej**

I. MRZYK, M. ZOŃ

*Zakład Badań Toksykologicznych, Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie*

Kontaktowe alergiczne zapalenie skóry jest jednym z głównych problemów zdrowotnych, którym zajmują się dermatolodzy, alergolodzy oraz immunotoksykolodzy. Ta najczęściej spotykana reakcja alergiczna jest zasadniczą przyczyną dermatoz zawodowych. Z punktu widzenia zdrowotnego, identyfikacja związków chemicznych o potencjalnych właściwościach uczulających w kontakcie ze skórą jest istotna w systemach klasyfikacji toksyczności. Ocena działania uczulającego na zwierzętach pozwala na ustalenie potencjalnego zagrożenia populacji narażonej na wielokrotny kontakt z daną substancją chemiczną. Do oceny działania uczulającego powszechnie stosuje się dwa rodzaje testów: test z kompletnym adjuwantem Freund'a (metoda Magnussona i Kligmanna) oraz test bez adjuwantu (metoda Buehlera). Test Magnussona i Kligmanna jest bardziej czuły niż test Buehlera, choć ocena histopatologiczna nie wyjaśnia przyczyny zmian w badanych narządach (skóra, węzeł chłonny i śledziona) ze względu na prozapalne działanie adjuwantu. Jednak procedura testu Buehlera lepiej odzwierciedla rzeczywiste narażenie na badaną substancję niż test z adjuwantem. Stosując test Buehlera unika się przecenienia potencjalnie bardzo słabych substancji uczulających, ale również istnieje zagrożenie niedocenienia potencjalnie silnych.

Celem pracy była ocena przydatności badań mikroskopowych do identyfikacji wystąpienia reakcji uczuleniowej u zwierząt w badaniach działania uczulającego prowadzonych metodą Buehlera.

Badania przeprowadzono dla substancji o znanych właściwościach uczulających, merkaptobenzotiazolu. Badania działania uczulającego przeprowadzono na świnkach morskich zgodnie z zaleceniami Wytycznej OECD do Badań Substancji Chemicznych nr 406 oraz Metody B.6. Uczulanie skóry. Po zakończeniu doświadczenia i przeprowadzeniu końcowych obserwacji skóry zwierząt, dodatkowo wykonano badania histopatologiczne skóry narażanej i nienarażanej oraz śledziony i węzła chłonnego (podżuchwowego).

W przeprowadzonym badaniu działania uczulającego, badaniem histopatologicznym ujawniono pobudzenie układu immunologicznego poprzez stwierdzenie zmian w śledzionie (pobudzenie miazgi białej) i w węzłach chłonnych (pobudzenie tkanki limfocytarnej). Zmianom tym nie towarzyszyły reakcje skórne.

## **The extension of Buehler skin sensitization test evaluation of chemical substances to microscopic examination of selected organs of guinea pig**

I. MRZYK, M. ZOŃ

*Department of Toxicological Research, Institute of Industrial Organic Chemistry Branch Pszczyna*

The contact allergic dermatitis is one of main health problems which dermatologist, allergologist and immunotoxicologist attend to. This prevalent allergic reaction is principal reason of occupational dermatopathy. Identification of chemical substances which have potential to cause allergic contact dermatitis is crucial for toxicological classification. Assessment of skin sensitization potential conducted on animals is helpful to establish potential hazard to population exposed to repeated contact with chemical substances. For assessment of allergic properties of chemical substances two methods are the most widely accepted: test with Freund's Complete adjuvant (Magnusson and Kligman test) and test without adjuvant (Buehler test). The Magnusson and Kligman test is more sensitive than the Buehler test, though the histopathological examination of skin, spleen and lymph node does not explain changes in organs due to proinflammatory activity of Freund's Complete adjuvant. However, procedure of the Buehler test better reflects the real exposure to substances than the test with adjuvant. Using the Buehler test one may avoid to overestimate potentially very weak allergic substances, however there is also the possibility to underestimate potentially strong allergens.

This work was performed in order to estimate the usefulness of microscopic examination for identification of occurrence of animal's allergic reaction. in the skin sensitization Buehler test.

Mercaptobenzothiazole, which is known to be mild to moderate sensitizer, was used in this study. The study was performed according to the OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406 and EU Method B.6: Skin sensitization. The histopathological examinations of the treated and untreated skin, the spleen and the lymph node (submandibular) were performed after termination of experiment and evaluation of treated skin. In this skin sensitization Buehler test, the histopathological examination of organs showed induction of immunological system. Changes in the spleen (induction of white splenic pulp) and the lymph nodes (induction of lymphocytic tissue) were stated. Simultaneously, no skin reactions were stated.

It is likely that extension of the Buehler test procedures to histopathological examination of organs, would give more detailed evaluation of potential skin sensitization properties of substances due to identification of immunological system induction stated on the ground of changes in spleen and lymph nodes.

## **Czy wyciąg z szafranu może być przydatny w terapii zespołu metabolicznego?**

J. BAJERSKA<sup>1</sup>, S. MILDNER – SZUDLARZ<sup>3</sup>, E. PRUSZYŃSKA – OSZMAŁEK<sup>2</sup>,  
M. TUBACKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Higieny Żywienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polska*

<sup>2</sup>*Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polska*

<sup>3</sup>*Instytut Technologii Pochodzenia Roślinnego Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polska*

**Wstęp:** Hiperglikemia, hiperlipidemia oraz nadmiar tkanki tłuszczowej to główne cechy zespołu metabolicznego, czynniki te zwiększają również ryzyko wystąpienia cukrzycy.

**Cel badań:** Celem niniejszej pracy była ocena możliwości wykorzystania ekstraktu z szafranu (0.08%) w terapii zespołu metabolicznego u szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową (25% tłuszczu), w połączeniu z jednokrotną, dootrzewnową iniekcją streptozotocyną (STZ) (30 mg/kg masy ciała).

**Rezultaty badań:** Szczury z wywołaną cukrzycą II stopnia, karmione dietą wysokotłuszczową wzbogaconą ekstraktem z szafranu, po 5 tygodniach trwania doświadczenia charakteryzowały się mniejszym przyrostem masy ciała ( $37.1 \pm 11.1$  g) w porównaniu z grupą kontrolną karmioną wyłącznie dietą wysokotłuszczową (bez wcześniejszej iniekcji STZ) ( $68.4 \pm 4.8$  g). W porównaniu z grupą kontrolną (CND) nieco mniejsze nagromadzenie tkanki tłuszczowej obserwowano w grupie DS. Dodatek do diety wysokotłuszczowej wyciągu z szafranu istotnie ( $P < 0.05$ ) obniżał stężenie insuliny w surowicy krwi bez wpływu na poziom glukozy i wielkość wskaźnika aterogenności.

**Podsumowanie:** Rezultaty uzyskane w niniejszych badaniach sugerują, że wyciąg z szafranu tylko w niewielkim stopniu sprzyja terapii zespołu metabolicznego i jego powikłań.

**Słowa kluczowe:** wyciąg z szafranu, zespół metaboliczny, szczury

## **Does saffron extract can be useful in metabolic syndrome therapy?**

J. BAJERSKA<sup>1</sup>, S. MILDNER – SZUDLARZ<sup>3</sup>, E. PRUSZYŃSKA – OSZMAŁEK<sup>2</sup>,  
M. TUBACKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Human Nutrition and Hygiene, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland*

<sup>2</sup>*Department of Animal Physiology and Biochemistry, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland*

<sup>3</sup>*Institute of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland*

**Background:** Hyperglycemia, hyperlipidemia, and excess adipose tissue are major features of metabolic syndrome which are also risk factors for the onset of diabetes.

**Aim:** In the present study we investigated whether saffron extract (at the dose of 0.08%) may improve therapy of metabolic syndrome in rats received high-fat diet (25% as a fat) coupled with a single streptozotocin STZ (30mg/kg body weight) injection.

**Results:** Diabetic rats fed a high-fat diet enriched with saffron extract (DS), after 5 weeks of treatment showed a tendency to a smaller body weight gain ( $37.1 \pm 11.1$ g) when compared to the control no-diabetic rats (CND) fed a high fat diet ( $68.4 \pm 4.8$ g). Also tendency to a smaller visceral fat accumulation in DS group in compared to CND group was observed. Treatment with saffron extract produced a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in insulin levels in without affecting glucose levels and atherogenic index of plasma.

**Conclusion:** In conclusion, the results obtained in the present investigation suggest that the saffron extract and its active constituent may only in some extend improve therapy of metabolic syndrome and its complications.

**Key words:** saffron extract, metabolic syndrome, rats

## **Badanie *in vivo* nowoczesnego opatrunku chitozanowego**

E. KARUGA<sup>1</sup>, A. ZAJĄC<sup>2</sup>, A. JANUS<sup>1</sup>, Z. RYBAK<sup>1</sup>, J. HANUZA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, Akademia Medyczna we Wrocławiu*

<sup>2</sup>*Katedra Chemii Bioorganicznej, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu*

*e-mail: ewa.karuga@gmail.com*

Trudno gojące się rany stanowią poważny problem współczesnej medycyny. Szacuje się że około 1,5 % społeczeństwa krajów rozwiniętych cierpi z powodu ran chronicznych. W leczeniu uszkodzeń skóry, oprócz usunięcia przyczyny, kluczową rolę pełni odpowiednio dobrany opatrunek.

Celem projektu badawczego jest ocena efektywności gojenia rany z wykorzystaniem nowoczesnego opatrunku chitozanowego.

Zgodnie z wymogami norm PN-EN ISO 10993-10:2009, PN-EN ISO 10993-6:2009 oraz PN-EN ISO 10993-11:2009 nie ma obecnie zatwierdzonych i walidowanych alternatywnych metod zastępujących zwierzęta kręgowo innym materiałem w tym testami *in vitro*, dlatego też do badań wybrano szczury szczepu outbredowego – Wistar. Na prowadzenie badań z wykorzystaniem zwierząt kręgowych uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu, uchwała nr 4/2011 z dn.19.01.2011 r.

Zabieg wykonywania ubytków skórnych prowadzony jest w stanie znieczulenia ogólnego przy zachowaniu zasad aseptyki chirurgicznej. Po zabiegu rany zaopatrywane są badanym materiałem opatrunkowym. Podstawę prawną prowadzonych procedur stanowią normy: PN-EN ISO 10993-1:2010 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem”; PN-EN ISO 10993-2:2006 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 2: Wymagania dotyczące postępowania ze zwierzętami”; PN-EN ISO 10993-6:2009 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 6: Badania Miejscowej reakcji po implantacji ” oraz Ustawa o wyrobach medycznych z dnia 20 maja 2010 roku.

W wyznaczonych terminach zwierzęta poddawane są eutanazji zgodnie z zaleceniami zawartymi w Laboratory Animals (1996) 30, 293-316 i (1997)31, 1-32. Pobrane sekcyjnie próbki poddawane są obróbce histologicznej i immunohistochemicznej.

Oczekuje się uzyskać wyniki potwierdzające skuteczność gojenia ran z wykorzystaniem opatrunku chitozanowego.

## ***In vivo* study of chitosan dressing**

E. KARUGA<sup>1</sup>, A. ZAJĄC<sup>2</sup>, A. JANUS<sup>1</sup>, Z. RYBAK<sup>1</sup>, J. HANUZA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Experimental Surgery and Biomaterial Research, Medical University of Wrocław*

<sup>2</sup>*Department of Bioorganic Chemistry, Wrocław University of Economics*

*e-mail: ewa.karuga@gmail.com*

Slowly healing wounds are a serious problem of modern medicine. It is estimated that approximately 1.5% of the population of developed countries suffer from chronic wounds. In the treatment of skin lesions properly selected dressing plays an important role.

The aim of this project is to evaluate the effectiveness of wound healing with chitosan wound dressing.

In compliance with the standards PN-EN ISO 10993-10:2009, ISO 10993-6:2009 and ISO 10993-11:2009 does not currently approved and validated alternative methods to replace vertebrate animals, therefore, outbred strain Wistar rats are used in project. Research project was approved by the Local Ethical Committee for Experiments on Animals in Wrocław, Resolution No.4/2011(19.01.2011).

The skin lesions is performed in a state of general anesthesia. After the intervention, the wounds are covered with chitosan dressing. The legal basis of the procedures are: PL EN ISO 10993-1:2010 "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing in the risk management process"; ISO 10993-2:2006 "Biological evaluation of medical devices - Part 2: Requirements for the handling of animals"; ISO 10993-6:2009 "Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests of local effects after implantation" and the Medical Devices Act of 20 May 2010. After observation time the animals will be euthanized in accordance with the recommendations of Laboratory Animals (1996) 30, 293-316 and (1997) 31, 1-32. Samples taken during autopsies are subjected to histological and immunohistochemical processing.

We are expecting to get the results confirm the efficacy of wound healing with chitosan dressing.

## **Europejskie Stowarzyszenie Lekarzy Weterynarii Zwierząt Laboratoryjnych – ESLAV** **P. SOWIŃSKI**

*Reprezentant ESLAV na terenie Wielkiej Brytanii i Polski*

Pomimo powstania w wielu krajach Wspólnoty szerokiej gamy organizacji zawodowych sektora zwierząt laboratoryjnych, jeszcze do niedawna nie było jednego weterynaryjnego przedstawiciela na poziomie europejskim. Nie było zawodowej organizacji podejmującej ważne decyzje z zakresu medycyny weterynaryjnej zwierząt laboratoryjnych oraz ich dobrostanu.

Szybko zmieniające się znaczenie roli lekarza weterynarii w praktyce naukowo – badawczej, rosnąca potrzeba fachowego udziału w zarządzaniu zwierzętarniami, czy też w lokalnych Komisjach Etycznych doprowadziły do powstania 14 lat temu Europejskiego Stowarzyszenia Lekarzy Weterynarii Zwierząt Laboratoryjnych.

Lekarze weterynarii, którzy często są konsultantami w placówkach naukowo badawczych, potrzebują utrzymania na bieżąco swej wiedzy zawodowej a także bycia na czasie ze zmieniającymi się europejskimi przepisami prawno – zawodowymi. To umożliwia im ESLAV.

Jednym z celów Stowarzyszenia było stworzenie zawodowego internetowego forum dyskusyjnego. Weterynaryjni specjaliści wszystkich krajów mają możliwość codziennej wymiany zdań, szukania pomocy oraz dyskusowania bieżących problemów.

Celem corocznych spotkań naukowych, oprócz dydaktyki i podnoszenia wiedzy fachowej swych członków, jest także budująca wymiana opinii i poznanie europejskiego weterynaryjnego środowiska.

ESLAV utrzymuje stosunki z krajowymi, międzynarodowymi i rządowymi przedstawicielstwami w Europie a także współpracuje z podobnymi organizacjami pozaeuropejskimi.

W ciągu ostatnich lat ESLAV odegrało znaczną rolę przy tworzeniu i wprowadzeniu w życie nowej, uchwalonej rok temu Dyrektywy 2010/63 EWG.